

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Klinik III - Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
der Universität Rostock**

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Junghanß

**Untersuchungen zur Bedeutung und Regulation des Wnt/ β -Catenin-
Signalwegs in akuten lymphatischen Leukämien**

Inauguraldissertation

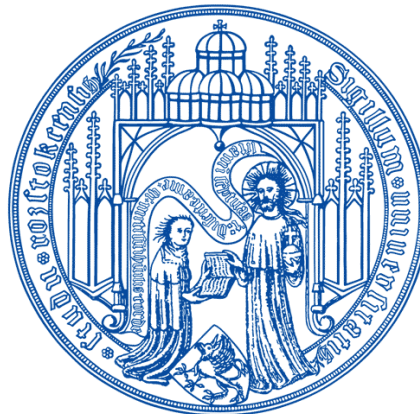
zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Tina-Susann Jaswal (geb. Langhammer), geb. am 08.09.1985 in Magdeburg

Rostock, April 2018

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002436

Gutachter:

Prof. Dr. Christian Junghanß, Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin

Prof. Dr. Reinhard Schröder, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abt. Genetik

Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo, Leibniz Universität Hannover, Institut für Zellbiologie und Biophysik

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2019

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1 Die akute lymphatische Leukämie	1
1.1.1 Allgemeine Charakteristika und Inzidenz	1
1.1.2 Mögliche Entstehungsmechanismen der ALL	1
1.1.3 Zytogenetische Aberrationen	2
1.2 Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg	4
1.2.1 Einführung in die Wnt-Signaltransduktion	4
1.2.2 Signalwegsinitiierung an der Zelloberfläche	5
1.2.3 Signalweg im Zytoplasma – Abbau und Akkumulation von β -Catenin	7
1.2.4 Signalweiterleitung im Nukleus	7
1.2.5 Der Wnt/ β -Catenin Signalweg in Leukämien	9
1.2.6 Der PI3K/Akt-Signalweg in der ALL	12
1.3 MicroRNAs	13
1.3.1 Wirkmechanismus von miRs	13
1.3.2 Die miR-126	13
1.3.3 Die miR-210	14
1.3.4 Die miR-214	14
1.4 Zielstellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Zellbiologische Techniken	16
2.1.1 Zellkultur	16
2.1.2 Bestimmung der Anzahl viabler Zellen	18
2.1.3 Behandlung der ALL-Zelllinien mit Liganden und Antagonisten des Wnt/ β -Catenin- und PI3K/Akt-Signalwegs	18
2.1.4 Phenol/Guanidin-basierte Lyse von humanen Leukämiezellen	19
2.1.5 RIPA-basierte Lyse von humanen Leukämiezellen	19
2.1.6 Herstellung von Zytospins	19
2.1.7 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	20
2.1.8 Isolierung von B- bzw. T-Lymphozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts mittels magnetischer Beads	20
2.1.9 Durchflusszytometrie	21
2.1.10 WST-1 Stoffwechselaktivitätstest	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1 Genexpressionsanalyse	23
2.2.1.1 RNA-Isolierung	23
2.2.1.2 cDNA-Synthese	24

2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.1.4	Die Quantifizierung der relativen Genexpression mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode	26
2.2.2	Chromosomenanalyse von ALL-Zellen	28
2.3	Proteinbiochemische Methoden	28
2.3.1	Fraktionierung von Proteinen	28
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.3.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.3.4	Western Blot	30
2.3.5	Spezifischer Antikörpernachweis und Visualisierung der Proteine	31
2.3.6	Immunfluoreszenz	32
2.4	Statistik	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Studien zur Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen	35
3.1.1	Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs	35
3.1.2	Induktion einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Wnt3a-Stimulierung	38
3.1.3	Einfluss von Wnt3a auf die metabolische Aktivität von ALL-Zellen	44
3.1.4	Expression bekannter universeller Wnt-Zielgenen nach Wnt3a-Stimulierung	45
3.2	Untersuchungen zur Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/β-Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen	47
3.2.1	Einfluss von PI3K/Akt-Modulatoren auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg	47
3.2.2	Einfluss von Wnt/ β -Catenin-Modulatoren auf den PI3K/Akt-Signalweg	50
3.3	Die Expression der miR-126, -210 und -214 in ALL-Zellen	51
4.	Diskussion	59
4.1	Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in ALL-Zellen	59
4.2	PI3K/Akt – Wnt/β-Catenin Interaktionen	60
4.2.1	Signalwegsinteraktion entlang der Achse PI3K/Akt - Wnt/ β -Catenin	60
4.2.2	Signalwegsinteraktion entlang der Achse Wnt/ β -Catenin – PI3K/Akt	61
4.3	Der Wnt/β-Catenin-Signalweg in ALL-Zellen	62
4.3.1	Kaum aktiver Wnt-Signalweg in Zelllinien der ALL	62
4.3.2	Limitationen einer induzierten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen	63
4.3.3	Hinweise eines aberrant inaktiven Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen: zytogenetische Analyse an den Beispielen REH und CEM	65
4.3.4	Dominante zytogenetische Aberrationen und ein möglicher Zusammenhang mit der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion in ALL-Primärzellen	67
4.4	Veränderte miR-Signatur in Zellen der ALL	68
4.4.1	Mögliche Deregulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch miR-214-Überexpression	68
4.4.2	Die Expression der miR-126 und miR-210 in ALL-Zellen	68
4.5	Hypothetische Interpretation einer aberranten Inaktivierung des Wnt-Signalwegs	69
5.	Zusammenfassung und Ausblick	72
6.	Literaturverzeichnis	74
7.	Anhang	86

7.1	Material	86
7.1.1	Chemikalien	86
7.1.2	Kits und Fertiglösungen	87
7.1.3	Nährmedien und Antibiotika	87
7.1.4	Enzyme	87
7.1.5	Antikörper	88
7.1.6	Verbrauchsmaterialien	89
7.1.7	Geräte	90
7.2	Ergänzende Abbildungen	91
8.	Wissenschaftlicher Lebenslauf einschl. Publikationsverzeichnis	101
9.	Selbstständigkeitserklärung	103
10.	Danksagung	104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der PI3K/Akt- (A) und Wnt/ β -Catenin-Signalwege (B).	4
Abbildung 2: qPCR-Effizienzen von Wnt-Zielgenen (A) und miRs (B).	27
Abbildung 3: Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs (A) und des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (B) in ALL-Zelllinien.	35
Abbildung 4: Endogene β -Catenin-Expression in ALL-Zelllinien.	37
Abbildung 5: Wnt3a-Stimulation von ALL-Zelllinien mit endogen schwach-aktivem Wnt-Signalweg.	38
Abbildung 6: β -Catenin-Nachweis nach Wnt3a-Behandlung in ALL-Zelllinien.	40
Abbildung 7: Intrazelluläre β -Catenin-Verteilung in ALL-Zelllinien nach Wnt3a-Behandlung (Immunfluoreszenz).	42
Abbildung 8: Zytoplasmatisches und nukleäres β -Catenin nach Wnt3a-Behandlung (Western Blot).	43
Abbildung 9: Metabolische Aktivität von ALL-Zellen nach Wnt3a-Behandlung.	45
Abbildung 10: Expression von Wnt-Zielgenen nach Wnt3a-Behandlung in ALL-Zelllinien.	46
Abbildung 11: Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels FLT3 Ligand in SEM-Zellen.	48
Abbildung 12: Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels LY294002 in SEM-Zellen.	49
Abbildung 13: Der Einfluss von Wnt3a auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalwegs.	50
Abbildung 14: Die Expression der miR-126 in ALL-Zelllinien (A) und <i>de novo</i> ALL-Zellen (B).	53
Abbildung 15: Die Expression der miR-210 in ALL-Zelllinien (A) und <i>de novo</i> ALL-Zellen (B).	54
Abbildung 16: Die Expression der miR-214 in ALL-Zelllinien (A) und <i>de novo</i> ALL-Zellen (B).	55
Abbildung 17: Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs von miR-Expression mit dem Gesamtüberleben von ALL-Patienten.	58
Abbildung 18: Atypische Wnt3a-induzierte Signalweiterleitung in ALL-Zelllinien.	64
Abbildung 19: β -Catenin-Nachweis nach Wnt3a-Behandlung in den SEM, Jurkat und REH.	92
Abbildung 20: Nachweis von β -Catenin nach FLT3 Ligand-Behandlung in CEM, MOLT-4 und RS4;11.	93
Abbildung 21: Nachweis von β -Catenin nach LY294002-Behandlung in CEM und MOLT-4.	94
Abbildung 22: Expression von Proteinen des PI3K/Akt-Signalwegs nach Wnt3a-Stimulierung.	95
Abbildung 23: Karyogramm der ALL-Zelllinie REH.	96

Abbildung 24: Karyogramm der ALL-Zelllinie CEM. _____ 97

Abbildung 25: Karyogramm der ALL-Zelllinie RS4;11. _____ 98

Abbildung 26: Karyogramm der ALL-Zelllinie SEM. _____ 99

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zytogenetische Aberrationen bei der ALL.	3
Tabelle 2: Mögliche Ursachen einer Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei Leukämien.	11
Tabelle 3: Karyotypen und Kulturbedingungen der verwendeten ALL-Zelllinien.	17
Tabelle 4: Verwendete Substanzen.	18
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für den Nachweis der Reinheit von B- und T-Zellen.	22
Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die Charakterisierung von ALL-Primärzellen.	22
Tabelle 7: cDNA-Synthese nach modifiziertem <i>SuperScriptTM II Reverse Transcriptase</i> - Protokoll.	25
Tabelle 8: qPCR-Ansatz zum Expressionsnachweis spezifischer miRs und Wnt-Zielgene.	25
Tabelle 9: qPCR-Protokoll unter definierten Temperaturbedingungen.	26
Tabelle 10: Herstellung von 5 x Probenpuffer für Western Blot.	29
Tabelle 11: Herstellung von Elektrophoresepuffer.	30
Tabelle 12: Herstellung von TBST.	31
Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper (Western Blot).	31
Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper (Western Blot).	32
Tabelle 15: Verwendete Antikörper (Immunfluoreszenz).	33
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse zur β Catenin-Translokation (Immunfluoreszenz vs. Proteinfractionierung).	44
Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse zur endogenen und induzierten Aktivierung des Wnt/ β Catenin-Signalwegs einschließlich Zielgenexpression.	51
Tabelle 18: Patientenkohorte der miR-Expressionsstudien.	57
Tabelle 19: Dominante zytogenetische Aberrationen und ihr möglicher Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg am Beispiel der ALL-Zelllinien REH und CEM.	67
Tabelle 20: Zytogenetische Aberrationen bei de novo-ALL-Zellen und ein möglicher Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg.	67
Tabelle 21: Gewinnung von Referenzzellen aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts.	91
Tabelle 22: Dominante zytogenetische Aberrationen der untersuchten ALL-Patienten.	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogen homolog</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
<i>AML1</i>	<i>Acute myeloid leukemia 1</i> Gen
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated gene</i> Gen
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
<i>BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 5</i> Gen
BSA	bovines Serumalbumin
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i> Gen
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CK1 α	<i>Casein Kinase 1 alpha</i>
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKK	Dickkopf
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>DNM3</i>	<i>Dynamin 3</i> Gen
DP	<i>double-positive</i> Status
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVL	<i>Disheveled</i>
<i>EGFL7</i>	<i>Epidermal growth-factor-like domain 7</i> Gen
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
<i>FLT3</i>	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i> Gen
FLT3L	FLT3 Ligand
FoxM1	<i>Forkhead box M1</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FZD	<i>Frizzled</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i>
HLF	<i>Hepatic leukemia factor</i> Gen
HMG	<i>High mobility group</i>
HOX11	<i>Homeobox 11</i> Gen
Ig	Immunglobulin(e)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
LDL	<i>low-density-lipoprotein receptor related protein</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i> Gen
LRP5/6	<i>Low density lipoprotein 5/6</i>
LZTS1	<i>Leucine zipper putative tumor suppressor 1</i>
miR/miRNA	microRNA
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i> Gen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSP	MACS-Separationspuffer
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MYC	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene homolog</i> Gen
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
np β -Catenin	nicht-phosphoryliertes β -Catenin
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
Nras	<i>Neuroblastoma Ras viral oncogene homolog</i>
pB	periphere Blut
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline with Tween 20</i>
PBX1	<i>pre-B-cell leukemia transcription factor</i> Gen
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PE	Phycoerythrin
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PORCN	<i>Porcupine</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAS/RAF/MEK/ERK	<i>rat sarcoma/rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase</i>

REAP	<i>rapid, efficient and practical</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNU48	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 48</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Ser	Serin
sFRPs	<i>secreted Frizzled related proteins</i>
SP	<i>single-positive Status</i>
<i>TAL1</i>	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia Gen</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
Tcf	<i>T-cell transcription factor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
<i>TCR$\alpha/\beta/\delta$</i>	<i>T-cell receptor $\alpha/\beta/\delta$ Gen(e)</i>
<i>TEL</i>	<i>Translocated ETS leukemia Gen</i>
Thr	Threonin
UMR	Universitätsmedizin Rostock
V/D/J	<i>variable/diversity/joining</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
WIF	<i>Wnt inhibitory factor</i>
WRE	<i>Wnt-responsive element</i>
WST1	<i>water-soluble tetrazolium salt-1</i>
β -TRCP	<i>β-transducin repeat-containing protein</i>

1. EINLEITUNG

1.1 Die akute lymphatische Leukämie

1.1.1 Allgemeine Charakteristika und Inzidenz

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine Neoplasie des blutbildenden Systems, die durch maligne Transformation lymphoider Zellen oder deren Vorläuferzellen (Lymphoblasten) entsteht. Durch einen Wachstumsvorteil der Tumorzellen kommt es zur klonalen Expansion und zur Anreicherung der Leukämiezellen im Knochenmark. Dort kommt es zur Störung der normalen Blutbildung mit entsprechender hämatopoetischer Insuffizienz, zur Ausschwemmung der Blasten in das periphere Blut (pB) und zur nachfolgenden Besiedlung anderer lymphatischer Gewebe. Die Leukämiezellen können auch weitere Organe infiltrieren und deren Funktion beeinträchtigen [1].

Die ALL ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die meist akut auftritt und unbehandelt in wenigen Wochen zum Tod führt. Die Gesamtinzidenz der ALL beträgt 1,1 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr und verläuft nach einer zweigipfligen Alterskurve. Mit ca. 25 Prozent ist die ALL die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Besonders häufig erkranken Kinder unter vier Jahren. Die Inzidenz fällt dann mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab, und steigt ab einem Alter von 35 Jahren erneut langsam an. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel liegt im Alter über 80 Jahren [2].

Während durch verbesserte Chemotherapien das Gesamtüberleben bei Kindern mit ALL sehr zufriedenstellend ist, etwa vier Fünftel von ihnen überleben fünf Jahre nach Erstdiagnose, trifft dies auf nur etwa zwei Drittel der Erwachsenen zu [2, 3].

1.1.2 Mögliche Entstehungsmechanismen der ALL

Charakteristisches Merkmal hämatologischer Neoplasien sind heterogene, zytogenetische Veränderungen. Etwa 75 Prozent aller B-ALL-Patienten weisen somatische Aneuploidien oder chromosomale Translokationen auf, die oft prognostische Relevanz haben [4]. Die Ursache hierfür liegt in der Aufgabe und Funktionsweise der Immunzellen. Das lymphatische System besteht aus zwei Hauptkompartimenten: den B-Zellen für die humorale Immunantwort und den T-Zellen für die zelluläre Immunantwort. Die Reifung beider Zelltypen erfolgt ständig aus hämatopoetischen Stammzellen, wobei die frühen Reifungsstadien der B-Zellen im Knochenmark und den Lymphknoten stattfinden und die T-Zellen im Thymus gebildet werden. Im Laufe des Reifungsprozesses bilden die Immunzellen spezifische Proteine auf der Zelloberfläche aus, die Immunglobuline (Ig) und T-Zell-Rezeptoren (TCR). Diese Antikörper und T-Zell-Rezeptoren bestehen aus mehreren Segmenten, den V(variable), D(diversity), J(joining)-Segmenten und einer konstanten Region. Die große Vielfalt der

sogenannten variablen Regionen der Proteine entsteht dadurch, dass es im Genom viele V-, D- und J-Regionen gibt, die während der Reifung von B- und T-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen zu reifen, exprimierbaren Genen durch Rekombination zusammengesetzt werden [5]. Diese sogenannte V(D)J-Rekombination, auch als somatische Rekombination bezeichnet, ist eine physiologische Gen-Rearrangierung, bei der enzymvermittelt an Ig- und TCR-Genloki flankierenden hochkonservierten Rekombinations-Signalsequenzen DNA-Doppelstrangbrüche induziert und diese anschließend über den sogenannten *Non-homologous end joining*-Reparaturmechanismus ligiert werden [5].

Chromosomale Aberrationen in humanen lymphoiden Tumoren betreffen häufig rekombinierte Antigen-Rezeptor-Loki. Diese Form der illegitimen V(D)J-Translokation involviert neben den Ig/TCR-Genbereichen andere Gene, also Nicht-Antigen-Rezeptor Gene, welche zur V(D)J-Rekombinations-Signalsequenz Homologie aufweisen. Diese aberrante Form der V(D)J-Translokation kann mit einer dysregulierten Expression von Proto-Onkogenen assoziiert sein und wird daher als frühes pathogenes Ereignis in der Onkogenese angesehen. Die aberrant fusionierten Genbereiche können Onkogene betreffen, die Deletion von Tumorsuppressorgenen implizieren oder neue Proteine mit genregulativer Funktion hervorbringen [6]. So können durch illegitime Rekombination beispielsweise Proteine mit Helix-Loop-Helix- oder Zinkfinger-Motiven entstehen, welche durch Regulation der Genexpression beispielsweise das Zellwachstum beeinflussen [7].

Auch Rekombinase-unabhängige Mechanismen, wie beispielsweise die homologe Rekombination zwischen spezifischen repetitiven DNA-Sequenzen, sogenannten Alu-Elementen, können chromosomale Aberrationen hervorbringen [8].

1.1.3 Zytogenetische Aberrationen

Genetische Veränderungen wie chromosomale Aberrationen sind ein charakteristisches Merkmal der akuten lymphatischen Leukämie [9]. Das Auftreten zahlreicher verschiedener zytogenetischer Veränderungen verdeutlicht die Heterogenität der ALL und wird für Aussagen zur Prognose und Therapieentscheidung herangezogen. In den meisten Fällen von mit der ALL-assoziierten Translokationen kommt es zur Fusion von Genen, die in der Folge aktiviert werden. Oft sind Transkriptionsfaktoren betroffen oder Kinasen essentieller Signaltransduktionswege, die wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation oder Apoptose beeinflussen [10].

Die häufigste chromosomale Translokation bei der ALL des Erwachsenen ist die Translokation t(9;22)(q34;q11), die zur Entstehung des Philadelphia-Chromosoms führt. Die Fusion der Kinase BCR (*Breakpoint cluster region*) mit der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase ABL1 (*Abelson murine leukemia*

viral oncogen homolog 1) induziert eine konstitutive Kinaseaktivität des Fusionsproteins. Dieses ist zur Aktivierung zahlreicher Signalwege, wie RAS/RAF/MEK/ERK oder PI3K/Akt, befähigt.

In Tabelle 1 werden weitere häufig bei der ALL vorkommende chromosomale Aberrationen sowie ihre Inzidenz und prognostische Relevanz vorgestellt.

Tabelle 1: Zytogenetische Aberrationen bei der ALL. (modifiziert nach [11])

chrom. Aberration	(Fusions-)Gen	Inzidenz [%]		Prognose
		Erwachsene	Kinder	
B-ALL				
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	30	3	ungünstig [12]
del(11)(q22)	ATM	25 – 30	15	ungünstig [13]
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	5	60 (Neugeb.)	ungünstig [14]
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	5	5	intermediär [15]
t(12;21)(p13;q21)	TEL-AML1	< 1	20	günstig [16]
t(17;19)(q22;p13)	E2A-HLF	< 1	< 1	ungünstig [17]
t(8;14)(q24;q32)	MYC-IgH	< 1	< 1	nicht bekannt
T-ALL				
t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCRα/δ	31	7	günstig [18]
t(5;14)(q35;q32)	HOX11L2-TCRβ	13	20	ungünstig [19]
t(1;14)(p32;q11)	TAL1-TCRα/δ	1 – 3	1 – 3	günstig [20]

Zytogenetische Aberrationen beeinflussen häufig zelluläre Signalwege und vermitteln deren konstitutive Aktivierung bzw. Inaktivierung. In Abbildung 1 werden zwei wichtige Signalkaskaden vorgestellt, die mit der Entstehung von lymphoiden und myeloiden Leukämien in Verbindung gebracht werden. Es handelt sich dabei um den PI3K/Akt- und den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, die in den folgenden Kapiteln näher vorgestellt werden.

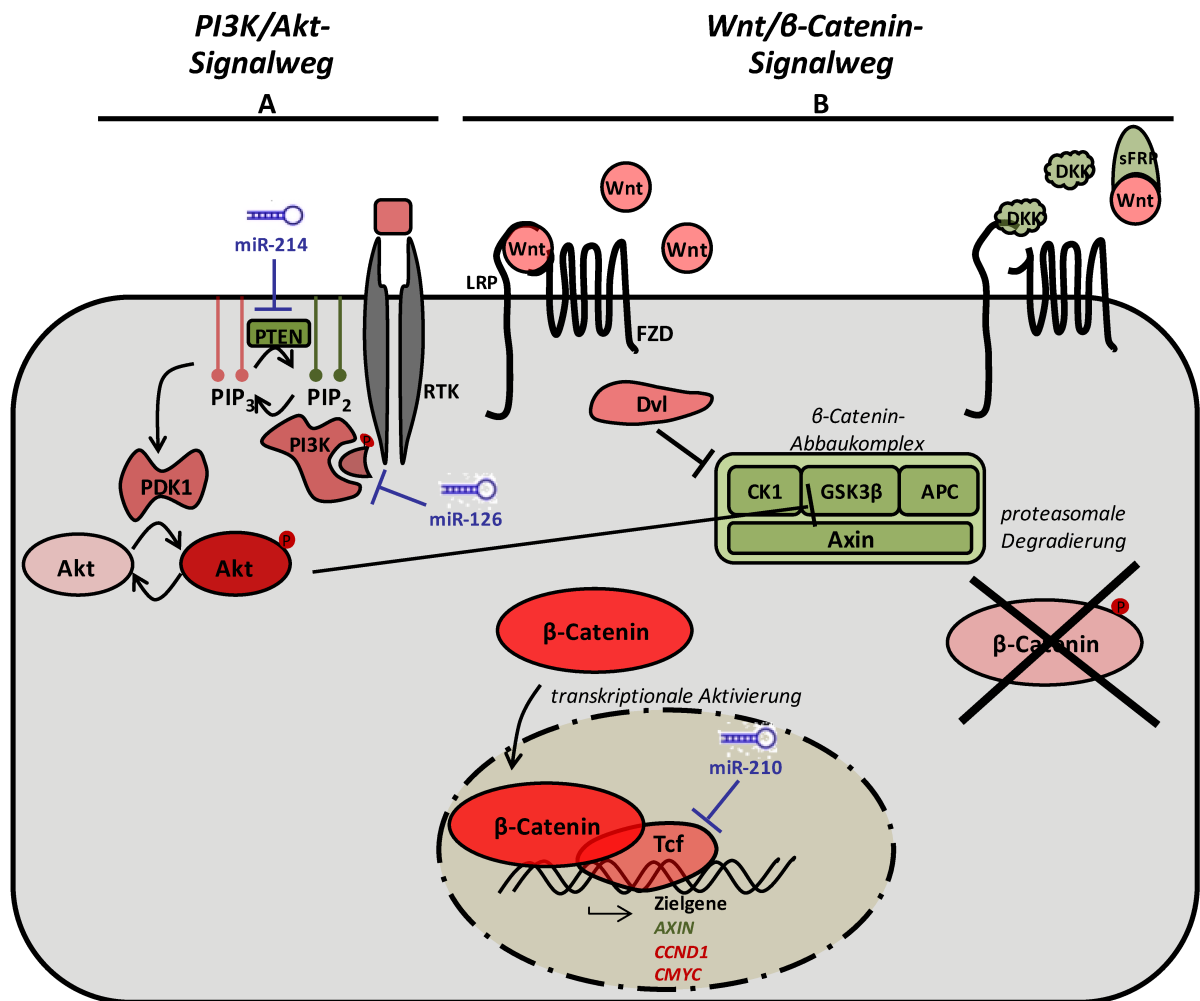


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der PI3K/Akt- (A) und Wnt/β-Catenin-Signalwege (B).

Mit Rottönen hervorgehobene Proteine verdeutlichen potentielle Onkogene, die eine Aktivierung der Signalkaskaden bewirken, grün dargestellte Proteine vermitteln eine negative Regulation der Signalwege.

1.2 Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg

1.2.1 Einführung in die Wnt-Signaltransduktion

Wnt-Proteine gehören einer hochkonservierten Familie sekretierter Glycoproteine an. Sie binden an spezifische Rezeptoren und stimulieren distinkte intrazelluläre Signalwege im Rahmen zellbiologischer und entwicklungsbiologischer Prozesse. Während der Entwicklung beeinflussen Wnt-Liganden unter anderem die Zellproliferation, -Migration, -Polarität und Apoptose [21]. Allen Wnt-Proteinen ist ihre charakteristische Struktur in Form von 23 bis 24 Cystein-Resten und einem N-terminalen Signalpeptid gemein. Die Zugehörigkeit zur Wnt-Familie basiert also primär auf Sequenzhomologie als auf funktioneller Gemeinsamkeit [22]. Bislang wurden mittels Sequenzierungen 19 unterschiedliche Wnt-Proteine im humanen Genom identifiziert [23]. Einige von ihnen wirken über den sogenannten kanonischen Wnt-Signalweg, welcher als erster Wnt-Signalweg beschrieben wurde. Das Schlüsselprotein dieses Signalwegs ist β-Catenin, weshalb er auch

als Wnt/ β -Catenin-Signalweg bezeichnet wird. Andere Wnt-Liganden vermitteln ihre Reaktionen über nicht-kanonische Wnt-Signalwege, von deren Art bislang zwei beschrieben sind: der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg und der Wnt/PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg (zusammengefasst in [24]).

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wird durch Bindung sezernierter Wnt-Proteine an Rezeptoren der FZD (*Frizzled*)-Familie und deren LRP5/6 (*Low density lipoprotein 5/6*)-Corezeptoren realisiert. In Zellen, in denen der Wnt-Signalweg nicht aktiv ist, wird zytoplasmatisches β -Catenin durch den sogenannten Abbaukomplex kontinuierlich N-terminal phosphoryliert, und als Folge dessen ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut. Der β -Catenin-Abbaukomplex enthält als zentrale Moleküle die Proteine APC (*Adenomatous polyposis coli*), CK1 α (*Casein Kinase 1 alpha*) und GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) sowie das Gerüstprotein Axin.

Dieser Zustand wird durch die Interaktion des Wnt-Liganden mit seinem heterodimeren Rezeptor FZD/LRP an der Zelloberfläche unterbrochen. In der Folge kommt es über Phosphorylierungen des Multiadapterproteins DVL (*Disheveled*) zur Inhibition des Abbaukomplexes und zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Stabilisiertes, im Zytoplasma akkumuliertes β -Catenin transloziert anschließend in den Zellkern und aktiviert dort Zielgene durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef (*T-cell transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor*) – Familie [25]. Essentielle universelle Wnt-Zielgene sind z.B. *CCND1* (kodiert für Cyclin D1), *LEF1* und *MYC* (*avian myelocytomatosis virus oncogene homolog*) [26].

1.2.2 Signalwegsinitiierung an der Zelloberfläche

Der Vielzahl unterschiedlicher Wnt-Liganden steht eine ebenso große Anzahl verschiedener Bindungspartner an der Oberfläche Wnt-sensitiver Zellen zur Verfügung. Im Folgenden werden die klassischen zur Initialisierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs benötigten Mediatorproteine vorgestellt.

Wnt-Liganden

Wnt-Liganden bilden eine im Reich der Metazoa hoch konservierte Glycoprotein-Familie. In Säugetieren wird die Komplexität und Spezifität der Wnt-Signaltransduktion über 19 unterschiedliche Wnt-Liganden realisiert, welche cysteinreiche Proteine mit 350 bis 400 Aminosäuren und einem für die Sekretion essentiellen N-terminalen Signalpeptid sind. Murines Wnt3a, das erste isolierte und biochemisch charakterisierte Wnt-Protein, erfährt im Laufe seiner Biogenese posttranslational essentielle Lipidmodifikationen [27]. Neben dem Liganden Wnt3a gibt es weitere Wnt-Proteine, die ausschließlich den β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg stimulieren, beispielsweise Wnt1 und Wnt8. Im Gegensatz dazu sind andere sezernierte Wnt-Moleküle zur

Initiierung der nicht kanonischen Wnt-Signalwege befähigt, wie Wnt4, Wnt5a und Wnt11 [28].

Wnt3a gilt als essentieller Ligand in hämatopoetischen Stammzellen [29]. Das Protein ist erforderlich für die Bewahrung eines undifferenzierten Phänotyps hämatopoetischer Stammzellen und induziert charakteristische Merkmale hämatopoetischer Stammzellen in hämatopoetischen Progenitorzellen [30, 31]. Es besteht keine funktionale Redundanz mit anderen Wnt-Liganden in hämatopoetischen Stammzellen [29].

Heterodimere Wnt-Rezeptoren: FZD und Corezeptor LRP5/6

Für den kanonischen Wnt-Signalweg sind insbesondere zwei Rezeptorfamilien von essentieller Bedeutung: Rezeptoren der FZD-Familie und die LDL (*low-density-lipoprotein receptor related protein*) -Rezeptorfamilie. Erstere ist eine Gruppe von sogenannten Sieben-Transmembran-Rezeptoren, die von charakteristischer Struktur sind: Eine extrazelluläre N-terminale Domäne mit 20 stark konservierten Cysteinen enthält sogenannte CRD (*cysteine-rich domain*) -Abschnitte und ist für die Bindung der Liganden notwendig. Die transmembranen alpha-Helices sind von der intrazellulären Region abzugrenzen, die aus drei intrazellulären Loops und dem zytoplasmatischen C-Terminus besteht. Dieser enthält das für die kanonische Signaltransduktion essentielle Juxtamembranmotiv KXXXXW [32]. Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie sind LRP5 und LRP6. Sie sind sogenannte Typ1 *singlepass*-Transmembranproteine und bestehen aus einer großen extrazellulären und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne [33]. Beide LRP-Proteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung bzw. der durch sie vermittelten biologischen Effekte. Während LRP6 Signaltransduktionen im Rahmen der Embryogenese assistiert [34], wurde LRP5 als unerlässlich für die Homöostase im adulten Knochengewebe beschrieben [35]. Auch metabolische Defekte wurden in LRP5-defizienten Mäusen nachgewiesen [36]. Funktionelle Studien deuten dennoch auf eine partielle Redundanz beider Proteine hin, da ihr gemeinsames Vorkommen für die murine Gastrulation essentiell ist [37].

Wnt-Antagonisten

Eine Vielzahl sekretierter Proteine ist in der Lage den Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch kompetitive Hemmung zu modulieren. Ein Antagonismus von β -Catenin zu LRP5/6 wird z.B. durch DKK (Dickkopf)-Proteine vermittelt, während der genaue Mechanismus dieser kompetitiven Hemmung noch nicht im Detail aufgeklärt ist. Andere Proteine, die einen funktionellen Antagonismus vermitteln, sind z.B. sFRPs (*secreted Frizzled related proteins*), die freie FZD-Bindungsstellen besetzen und für Wnt-Liganden unzugänglich machen [38] oder durch direkte Bindung an Wnt-Liganden dessen Bindungsstellen blockieren [39]. Ein ähnlicher Wirkmechanismus ist für die zu Wnt-Liganden eine hohe Affinität aufweisenden WIF (*Wnt inhibitory factor*)-Proteine beschrieben [40].

Während sFRPs und WIFs sowohl kanonische als auch nicht kanonische Wnt-Signalwege blockieren können, wird für DKK-Proteine aufgrund ihrer Affinität zu LRP-Corezeptoren ausschließlich ein inhibitorischer Effekt des kanonischen Wnt-Signalwegs angenommen [41].

1.2.3 Signalweg im Zytoplasma – Abbau und Akkumulation von β -Catenin

Das zentrale Molekül des kanonischen Wnt-Signalwegs β -Catenin ist hoch konserviert und besteht aus zwölf sogenannten Armadillo-Repeats. Diese nach dem β -Catenin Ortholog in *Drosophila melanogaster* benannten Motive dienen als Bindungsstellen für zahlreiche Interaktionspartner [42]. N-terminal befinden sich potentielle Phosphorylierungsstellen, welche den Proteinen GSK3 β , CK1 α und der Ubiquitin-Ligase als Substrat dienen und eine Inaktivierung von β -Catenin zur Folge haben. Die C-terminal lokalisierten Domänen von β -Catenin sind von großer Bedeutung für die Interaktion mit Proteinen der Tcf/Lef-Familie.

Das Fehlen eines Wnt-Stimulus an der Zelloberfläche Wnt-sensitiver Zellen wird begleitet von der Formation des β -Catenin Abbaukomplexes, bestehend aus APC, CK1 α , GSK3 β und Axin. Dieser Abbaukomplex vermittelt in der Folge spezifische sequentielle Phosphorylierungen an β -Catenin, initial durch die Kinase CK1 α an Ser45, gefolgt von der Phosphorylierung der Aminosäuren Thr41, Ser37 und Ser33 durch GSK3 β . Die zwei letzteren Phosphorylierungen stellen einen essentiellen Schritt für den proteasomalen Abbau von β -Catenin dar. Sie werden von dem F-Box-Protein β -TRCP (*β -transducin repeat-containing protein*) erkannt, welches den proteasomalen Abbau einleitet [43].

Kommt es zur Bindung von Wnt-Liganden an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche Wnt-sensitiver Zellen, werden unter Beteiligung des Proteins DVL die Proteine Axin und CK1 α zur Zytoplasmamembran rekrutiert. In der Folge zerfällt der β -Catenin-Abbaukomplex und β -Catenin reichert sich im Zytoplasma an [44].

1.2.4 Signalweiterleitung im Nukleus

Nach einer Wnt-induzierten Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma kommt es zur Translokation dieses wichtigen Effektorproteins in den Zellkern. Der genaue Mechanismus dieser nukleären Translokation ist noch nicht aufgeklärt. Man geht allerdings davon aus, dass β -Catenin nicht mit Hilfe einer NLS (*Nuclear localization signal*) -Domäne in den Nukleus gelangt [45]. Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen untermauern einen Cotransport von β -Catenin mit NLS-gekoppelten Proteinen, wie FoxM1 (*Forkhead box M1*) [46], Axin [47], APC [48] oder Joubertin [49]. Ein anderer möglicher Mechanismus der Translokation von β -Catenin in den Zellkern könnte über die Affinität des Proteins zum sogenannten NPC (*Nuclear pore complex*) vermittelt werden [50].

Insbesondere die Armadillo-Region zwischen Arm10 und Arm12 scheint für die Bindung an Nukleoporine essentiell zu sein [50].

Eine bedeutungsvolle Entdeckung für das Verständnis der transkriptionsaktivierenden Wirkung von β -Catenin war die Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor Lef [51] bzw. Tcf [52]. Sowohl Lef als auch Tcf repräsentieren Mitglieder der HMG (*High mobility group*)-Box-Transkriptionsfaktoren. Charakteristisch für HMG-Box-Transkriptionsfaktoren ist, dass sie lediglich in Komplexen mit Cotranskriptionsfaktoren funktionell aktiv sind. Dabei binden sie über die HMG-Box direkt an spezifische DNA-Konsensussequenzen, wo sie in Abwesenheit von β -Catenin die Genexpression unter Beteiligung von Corepressoren inhibieren [53]. Das gemeinsame Vorliegen von Tcf/Lef mit transkriptionellen Corepressoren aktiviert Histondeacetylasen. Diese modulieren die DNA-Faltung zugunsten einer transkriptionellen Hemmung über die Abspaltung von an Histonen gebundenen Acetylgruppen. Unter Anwesenheit von nukleärem β -Catenin werden die Corepressoren verdrängt und der β -Catenin-Tcf/Lef-Komplex stimuliert als transkriptioneller Aktivator die Genexpression von Wnt-Zielgenen. Dabei rekrutiert β -Catenin spezifische Chromatin-modellierende Proteine an die DNA, welche die Auflockerung dieser ermöglichen [53].

Als universelle Wnt-Zielgene wurden unter anderem die Gene *CCND1*, *MYC* und *LEF1* identifiziert, die im Folgenden genauer charakterisiert werden.

CCND1

Das Proto-Onkogen *CCND1* kodiert für das Protein Cyclin D1, welches ein wichtiger Bestandteil des Zellzyklus ist und zusammen mit anderen Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK, *Cyclin-dependent kinase*) die Zellproliferation reguliert. Die Bindung von CDK4/6 an ein D-Typ Cyclin wie Cyclin D1 und der anschließende Transport des Komplexes in den Nukleus sind essentiell für die Aktivierung der G1-Phase und den Übergang zur S-Phase [54]. In der Promotorregion von *CCND1* wurde eine Tcf/Lef-Bindungsstelle identifiziert, welche *CCND1* als universelles Zielgen des Wnt-Signalwegs charakterisiert [55].

MYC

Ein weiteres Proto-Onkogen, welches der Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs unterliegt, ist das Gen *MYC* (*avian myelocytomatosis virus oncogene homolog*). *MYC* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der seine biologische Funktion, die Regulation von Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose, über Regulation von spezifischen Zielgenen ausübt. In den letzten Jahren wurden mehrere Hundert potentielle Myc-Zielgene identifiziert, welche an verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen beteiligt sind: z.B. DNA-Synthese, Fettstoffwechsel, Proteinbiosynthese, DNA-Reparatur und Apoptose [56].

LEF1

Das *LEF1*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor und besitzt verschiedene alternative Promotoren, wobei der am weitesten stromaufwärts gelegene für das vollständige LEF1-Polypeptid kodiert. Dieses unterscheidet sich stark vom Genprodukt des weiter stromabwärts gelegenen alternativen Promotors. Dieses Phänomen beruht darauf, dass im Falle von Transkriptionsfaktoren mit alternativen Promotoren die Exone zwischen den Promotoren häufig für Transkriptionsaktivierungsdomänen kodieren [53].

Hovanes *et al.* beschrieb 2001 erstmals den am Ende der Wnt-Signalkaskade so essentiellen Transkriptionsfaktor LEF1 als Wnt-Zielgen selbst [57]. β -Catenin/Tcf-Komplexe können den ersten stromaufwärts gelegenen *LEF1*-Promotor aktivieren und so einen positiven *Feedback-Loop* der Wnt-Kaskade auslösen. Die Bindung von β -Catenin/Tcf ist auf diesen Promotor beschränkt durch Vorhandensein eines 110 Basenpaare-umfassenden WRE (*Wnt-responsive element*), welches im alternativen Promotor fehlt [58].

1.2.5 Der Wnt/ β -Catenin Signalweg in Leukämien

In zahlreichen Tumorentitäten wurde ein aberrant veränderter Wnt/ β -Catenin-Signalweg nachgewiesen. Überwiegend handelt es sich dabei um eine aberrant aktivierte Signaltransduktion. Unter den Tumorentitäten mit aberrant aktivierter Wnt/ β -Catenin-Signalkette befinden sich beispielsweise sporadische kolorektale Karzinome [59], Mamma- und Bronchialkarzinome [60], Parathyroidkarzinome [61], Pankreas- und Ovarialkarzinome [62] sowie hepatozelluläre Karzinome und Melanome [63].

Auch für die Pathogenese hämatopoetischer Neoplasien besitzt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Schlüsselstellung [64]. Das Effektorprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs, β -Catenin, besitzt essentielle Bedeutung für Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen [65]. Seit Langem ist bekannt, dass der Reifungsprozess von B- und T-Lymphozyten Wnt/ β -Catenin-abhängig ist [64, 66, 67]. So fand man eine hohe Aktivität der Signalkaskade vor allem in frühen B-Lymphozyten und in späten Thymozyten-Stadien [68, 69]. Auch innerhalb der Nische hämatopoetischer Stammzellen übernimmt die Signalkaskade eine wichtige biologische Bedeutung: sie bewahrt das Potential zur Selbsterneuerung und gewährleistet ein stabiles Gleichgewicht von Regeneration und Differenzierung [70]. Aberrationen der Wnt-Signalkaskade und nahestehender Proteine sind kausal bei der Entstehung verschiedenster Leukämien involviert [71]. Leukämien mit assoziierter Wnt/ β -Catenin-Fehlregulation werden im Folgenden vorgestellt.

AML

Die AML (akute myeloische Leukämie) ist im Kontext der Wnt-Signaltransduktion die am besten untersuchteste Leukämie. Ein aberrant aktivierter Wnt-Signalweg und seiner Zielgene gilt als ein häufiges charakteristisches Merkmal dieser spezifischen Leukämie [72]. Als Ursache dieser Wnt/ β -Catenin-Hyperaktivität werden unter anderem charakteristische AML-Translokationen wie AML-ETO und PML-RAR α diskutiert [73]. Auch in der AML oft nachgewiesene *FLT3* (*FMS-related tyrosine kinase 3*)-Mutationen, die zu einer aberranten Aktivierung dieser Kinase führen, werden mit einer Überaktivität der Wnt-Signalkaskade in Verbindung gebracht. Über eine FLT3-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin wird wahrscheinlich dessen nukleärer Transport eingeleitet und eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs realisiert [74]. Aktivierende FLT3-Mutationen konnten in etwa 30 Prozent aller AML-Patienten nachgewiesen werden und sind assoziiert mit erhöhten β -Catenin-Spiegeln, einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF sowie einer Induktion der *c-MYC*-Expression [75]. Durch epigenetische Veränderungen wie Promotor-Methylierungen von Wnt-Antagonisten werden diese entsprechenden Gene in AML-Zellen inaktiviert und eine Signalwegsinhibierung wird erschwert [76, 77].

CLL

Analog zu der AML wird auch für die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) eine aberrante Signalwegsaktivierung angenommen, beispielsweise durch die Überexpression von Wnt-Liganden wie Wnt3, Wnt5b, Wnt10a und Wnt16 [78, 79]. Auch andere Schlüsselproteine initial, FZD3 und LRP5/6, sowie endständig des Signalwegs, LEF-1, werden in CLL-Zellen signifikant hochreguliert [79]. Eine epigenetische Inaktivierung von Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermittelt vergleichbare Effekte, nämlich eine Akkumulation von β -Catenin in CLL-Zellen [80-82]. Die Existenz eines verkürzten LRP6-Rezeptors in CLL-Zellen wird diskutiert. Dieser weist wahrscheinlich keine extrazelluläre DKK-1-Bindungsdomäne auf und ist daher nicht in der Lage eine DKK-1 induzierte Hemmung der Signalkaskade zu vermitteln [83]. In Zellen der CLL konnten darüberhinaus eine erhöhte *LEF-1*-Expression sowie das Vorkommen von unphosphoryliertem β -Catenin nachgewiesen werden, welche in gesunden B-Zellen nicht detektiert wurde. Eine Unterbrechung der β -Catenin-LEF-1-Interaktion mittels spezifischer Inhibitoren inhibierte die Proliferation von CLL-Zellen [84].

ALL

Trotz intensiver Studien an der Wnt-Signalkaskade im Zusammenhang mit der Entstehung von humanen Leukämien und zahlreicher sehr aufschlussreicher Arbeiten, die eine funktionelle Schlüsselrolle des Signalwegs für die Pathogenese und Ätiologie verschiedenster Formen der Leukämie belegen, gibt es bisher nur wenige Daten zur Rolle des Wnt-Signalwegs in der ALL. Viele der existierenden Publikationen sind zugleich kontrovers [85-87].

So wurde im Mausmodell gezeigt, dass die Induktion einer aberranten Wnt/ β -Catenin-Aktivierung die Hämatopoese beeinträchtigte und sich in der Folge signifikant häufig lymphatische Leukämien entwickelten [85, 88]. In humanen T-ALL-Zellen wurde eine β -Catenin-Überexpression detektiert, deren Hemmung anti-proliferative Effekte vermittelte [89]. Eine andere Studie detektierte in etwa 85 Prozent aller untersuchten pädiatrischen T-ALLs erhöhte β -Catenin-Spiegel und eine vermehrte Expression der Zielgene *AXIN2*, *c-MYC*, *TCF1* und *LEF1*. Eine induzierte Hemmung von β -Catenin vermittelte Apoptose in den betreffenden T-ALL-Zellen [26]. Außerdem wurde gezeigt, dass sich selbst-regenerierende Leukämie-Stammzellen erhöhte Spiegel von unphosphoryliertem β -Catenin aufweisen und die experimentelle Ablation eines β -Catenin-Allels die Inzidenz von T-ALLs herabsetzte und die T-ALL-Pathogenese verzögerte [90].

Andere Arbeiten zeigten dagegen den tumorsupprimierenden Einfluss spezifischer Wnt-Liganden und konnten durch eine induzierte Wnt/ β -Catenin-Aktivierung die Proliferation von ALL-Zellen hemmen [91].

Auch bestehen kontroverse Auffassungen inwieweit die Hämatopoese der Regulation von Wnt/ β -Catenin unterliegt. Einige Studien weisen daraufhin, dass Differenzierungsprozesse der B- und T-Zellen β -Catenin abhängig sind [65-70]. Andere Arbeiten widerlegen dies und schließen einen Einfluss von β -Catenin bei der Hämatopoese und Lymphopoese aus [92, 93]. Tabelle 2 fasst die publizierten Aberrationen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Kontext verschiedener Leukämien zusammen.

Tabelle 2: Mögliche Ursachen einer Fehlregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei Leukämien.

Möglicher Mechanismus	Hämatologische Neoplasie	Literaturverweis
Expression und Sezernierung von Wnt-Liganden	CLL: Überexpression von Wnt3, Wnt5b, Wnt10a und Wnt16	[78, 79]
Epigenetische (Dys-)Regulation	AML: Promoter-Methylierungen von <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SFRP4</i> , <i>SFRP5</i> , <i>DKK1</i> CLL: Promoter-Methylierungen von <i>CDH1</i> , <i>DACT1</i> , <i>DKK1</i> , <i>DKK2</i> , <i>DKK3</i> , <i>DKK4</i> , <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>SFRP3</i> , <i>SFRP4</i> , <i>SFRP5</i> and <i>WIF1</i>	[76, 77] [80-82]
β -Catenin-Überexpression	AML: Translokationen (AML-ETO, PML-RARA) oder aktivierende Mutationen (FLT3) induzieren β -Catenin-Akkumulation CLL: erhöhte Spiegel von nicht-phosphoryliertem β -Catenin und <i>LEF1</i> ALL: konträr: erhöhte β -Catenin-Spiegel vs. Keine Wnt/ β -Catenin-Aktivierung	[73-75] [84] [26, 89] vs. [91]

1.2.6 Der PI3K/Akt-Signalweg in der ALL

Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert essentielle zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Wachstum, Metabolismus und Apoptose. Eine zentrale Rolle innerhalb der PI3K/Akt-Signalkaskade besitzt das Enzym Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), welches durch Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. PI3K-Proteine sind Heterodimere und bestehen aus einer kleinen regulatorischen (p85) und einer großen katalytischen (p110) Untereinheit, welche die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolbisphosphat in der Zytoplasmamembran zum *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) vermitteln [94]. Einen funktionellen Antagonismus zu PI3K besitzt das Tumorsuppressorprotein PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog), welches PIP3 dephosphoryliert [95]. PIP3 ist Substrat zahlreicher Enzyme und veranlasst die Rekrutierung von PH (*Pleckstrin homology*)-Domänen enthaltenden Proteinen zur Zytoplasmamembran, wie der Serin/Threonin-Kinase Akt und der Kinase PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*). Akt ist das zentrale Protein des PI3K/Akt-Signalwegs und erfährt durch die Kinasen PDK1 an Position Thr308 und mTORC2 (*Mechanistic target of rapamycin complex 2*) an Position Ser473 sequentielle Phosphorylierungen, die eine Enzymaktivierung induzieren (zusammengefasst in [96]). Die Kinase Akt reguliert über Phosphorylierungen zahlreiche Zielproteine, die an der Steuerung zellulärer Prozesse beteiligt sind, wie Zellzyklusarrest, Zellüberleben und Zellwachstum. Eines der Akt-Zielproteine ist das Enzym GSK3 β , welches ein mögliches Schlüsselmolekül in der Wnt/ β -Catenin – PI3K/Akt- Interaktion ist, wie in Abbildung 1 skizziert. So zeigten Studien, dass eine Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs eine Inaktivierung von Akt-Zielproteinen, u.a. GSK3 β , induziert und zu einer Akkumulation von β -Catenin führt [97, 98]. Auch eine direkte Interaktion von Akt mit β -Catenin, unabhängig von GSK3 β , ist denkbar. Forschungsergebnisse belegen eine Phosphorylierung von β -Catenin durch Akt an Position Ser552, welche zu einer Akkumulation des Proteins und Steigerung seiner transkriptionsaktivierenden Wirkung beiträgt [99].

Neben seiner Bedeutung für zahlreiche solide Tumorentitäten [100-103] wurde eine Hyperaktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs auch bei der ALL nachgewiesen [104, 105]. Der den PI3K/Akt-Signalweg negativ regulierende Tumorsuppressor PTEN ist in T-ALL-Zellen häufig deletiert bzw. posttranslational inaktiviert, was zu einer aberranten Aktivierung des Signalwegs führt [106, 107]. Darüber hinaus sind spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen des PI3K/Akt-Signalwegs, beispielsweise EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) oder FLT3, häufig von somatischen genetischen Veränderungen betroffen, welche eine Überaktivierung des Signalwegs in der B- und T-ALL induzieren [108, 109].

Forschungsergebnisse zeigen, dass zahlreiche Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalwegs Zytotoxizität in ALL-Zellen vermitteln: NVP-BE2235 (ein PI3K/mTOR-Inhibitor) [110, 111], RAD001 (ein selektiver

mTOR-Inhibitor) [104, 112], Rapamycin (ein mTOR-Inhibitor) [113], MK-2206 (ein allosterischer Akt-Inhibitor) [114] und weitere Substanzen inhibieren über Apoptose oder Zellzyklusarrest die Proliferation der Leukämiezellen.

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Wirkmechanismus von miRs

MicroRNAs (miRs, miRNAs) sind eine Gruppe etwa 21-25 Nukleotide-langer [115] nicht-kodierender RNA-Moleküle, die über Bindung an spezifische Ziel-mRNAs posttranskriptional die Genexpression regulieren. Sie sind an einer Vielzahl wichtiger biologischer Prozesse beteiligt wie Differenzierung, Proliferation, Metabolismus sowie Apoptose und spielen eine fundamentale Rolle für Wachstum und Entwicklung [116]. Durch ihre wichtige regulative Rolle für die Genexpression sind sie assoziiert mit Krankheiten wie Krebs, autoimmunen Erkrankungen oder viralen Infektionen, welche unter anderem durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen charakterisiert sind.

Es wurden bereits etwa 38.600 verschiedene miRs in mehr als 150 Spezies identifiziert, davon etwa 2.700 allein im menschlichen Genom [www.mirbase.org, Release 22 März 2018]. Schätzungsweise regulieren diese miRs wenigstens 20 Prozent aller menschlichen für Proteine kodierenden Gene [117]. In humanen Zellen vermitteln miRNAs eine negative Genregulation über den Prozess der translationalen Hemmung [116]: etwa durch eine Argonaut-vermittelte Bindungsreprimierung des Initiationsfaktors eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) [118] oder der Ribosomenuntereinheiten [119] an die mRNA durch sterische Inhibition.

1.3.2 Die miR-126

Der miR-126 Genlokus befindet sich auf Chromosom 9 im Bereich q34.3 im Intron 7 des Gens *EGFL7* (*Epidermal growth-factor-like domain 7*), welches stark in Endothelzellen exprimiert wird und in der Vaskulogenese die Gefäßbildung steuert [120, 121]. *EGFL7* und der miR-126 Genlokus unterliegen der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors und werden coexprimiert. Die miR-126 gilt als die bisher einzige identifizierte miR, deren Expression Endothelzell- und Blutprogenitorzell-spezifisch ist [122]. Besonders in stark vaskularisierten Geweben wie dem Herzen, der Lunge und dem Magen wurde eine starke miR-126-Expression beschrieben [123]. Aufgrund ihrer Bedeutung für Angiogenese und Vaskularisierung wurde der Beiname angiomiR-126 etabliert [124].

Eine Veränderung der miR-126-Expression wurde in diversen soliden Tumoren beobachtet wie Brust-, Lungen-, Gebärmutterhals-, Prostata-, Magen-, Leber-, Blasen- und Darmkrebs [125]. Zahlreiche Studien belegen eine Rolle der miR-126 als Tumorsuppressor-Molekül, dessen Expression

in Krebszellen vermindert ist [126]. Unter anderem vermitteln miR-126-Zielproteine über den PI3K/Akt- und andere Signalwege verschiedene zelluläre Effekte wie die Regulation angiogener Faktoren, z.B. VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*), oder stimulieren den Zellzyklus und die Proliferation [123].

1.3.3 Die miR-210

Die Stem-Loop-Struktur der miR-210 befindet sich im Intron einer nicht-kodierenden RNA, welche ausgehend vom Genlokus AK123483 transkribiert wird und sich auf Chromosom 11 im Bereich p15.5 befindet [127]. Die Expression dieser regulatorischen miR wird bei zellulärer Hypoxie aktiviert, weshalb sie zu der Gruppe der sogenannten hypoxamirRs gezählt wird [128]. Hypoxie ist einer der fundamentalen biologischen Prozesse im Rahmen der Pathogenese und Manifestation solider Tumoren und ein direkter Zusammenhang mit Zellproliferation, Zellüberleben, Angiogenese und Metastasierung wurde unlängst identifiziert [129].

Als miR-210 Zieltranskripte wurde unter anderem der Transkriptionsfaktor Tcf712 endständig des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs identifiziert [130], der wichtige regulative Aufgaben innerhalb des Zellzyklus übernimmt.

Eine Überexpression der miR-210 wurde in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen, wie in Karzinomen des Pankreas [131], der Lunge [132], der Brust [133], der Blase [134] und in Glioblastoma [135]. Im Rahmen klinischer Studien wurde die Korrelation einer hohen miR-210 Expression mit einer schlechten Prognose von Krebspatienten nachgewiesen und die Hypoxie-induzierte miR-210 als prognostischer Marker diskutiert [131, 133, 136].

1.3.4 Die miR-214

Der Genlokus der murinen miR-214 wurde erstmals im Jahr 2010 beschrieben und befindet sich in einem Intron des *DNM3* (Dynamamin 3)-Gens auf dem murinen Chromosom 1, wobei dieser genomische Bereich konserviert ist, von Zebrafisch bis zum Menschen [137]. Im Rahmen der ersten funktionellen Studien wurde das Expressionsmuster der miR-214 in der Maus untersucht und folgende Organe mit hoher miR-214 Expression identifiziert: Herz, Magen, Blase, Lunge, Darm und Muskelgewebe. Eine niedrige miR-214 Expression wurde in Leber, Gehirn, Hoden und Milz detektiert. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen deuteten auf eine Muskel-spezifische Funktion der miR-214 [137]. Ein über Array-Analysen identifiziertes Kandidaten-Zielprotein ist Nras (*Neuroblastoma Ras viral oncogene homolog*), welches den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus begünstigt und die myogene Differenzierung unterdrückt [137, 138]. Inzwischen wurden durch weitere unabhängige Studien eine tumorsuppressive Funktion der miR-214 nachgewiesen und

die miR-214 vermittelte Repression des Protoonkogens Nras belegt, die eine anti-proliferative Wirkung nach sich zieht [139]. Konträre Publikationen beschreiben die miR-214 selbst als Onkogen und identifizierten beispielsweise das Tumorsuppressorprotein PTEN als Zielprotein [140].

1.4 Zielstellung

Die Kenntnis von Ursache und Progression der ALL sowie ihren zugrundeliegenden biologischen Prozessen ist von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung von Therapiekonzepten. In den letzten Jahren konnten durch intensive Forschung aberrant aktivierte Signalwege identifiziert und neue Substanzen entwickelt werden, die eine Hemmung der hyperaktiven Signalkaskaden vermitteln. Der PI3K/Akt-Signalweg beispielsweise ist in ALL-Zellen aberrant aktiv. Der Nachweis von Aberrationen innerhalb der PI3K/Akt-Signalkaskade und dem Vorliegen hyperaktiver spezifischer Kinasen ermöglicht eine individuelle zielgerichtete Therapie der betroffenen Patienten.

Ziel dieser Arbeit war es, einen weiteren essentiellen zellulären Signalweg, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, und seine Bedeutung für die ALL zu untersuchen. Eine aberrante Hyperaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde bereits in unzähligen Tumorentitäten einschließlich humaner Leukämien nachgewiesen. Die Rolle dieses Signalwegs für die ALL ist jedoch noch unklar, da nur wenige, teils konträre Daten existieren. Zur Charakterisierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der ALL sollte die endogene Expression von Schlüsselproteinen in ALL-Zelllinien untersucht werden. Zentrales Interesse sollte hierbei auf das Schlüsselprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs, β -Catenin, gelegt werden, welches hinsichtlich seines Aktivierungsstatus untersucht werden sollte. Eine Analyse universeller Wnt-Zielgene diene einer umfassenden Charakterisierung des Wnt-Signalwegs auch endständig der Signaltransduktion. Ein möglicher Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die metabolische Aktivität von ALL-Zellen sollte analysiert werden, ebenso wie eine potentielle Interaktion des Signalwegs mit dem PI3K/Akt-Signalweg. Mit Hilfe von Liganden und Inhibitoren, die spezifisch jeweils einen der Signalwege adressieren, sollten Effekte auf Schlüsselproteine des jeweils anderen Signalwegs analysiert werden. Ferner sollten drei regulative miRs in ihrer Expression untersucht werden, um mögliche Ursachen der Signalwegs(de-)regulation aufzudecken. Die miR-126, -210 und -214 wurden bereits in anderen Tumorentitäten als potentielle Marker für Prognoseaussagen identifiziert und sollten auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer Korrelation mit dem Überleben von ALL-Patienten untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellbiologische Techniken

2.1.1 Zellkultur

Die verwendeten humanen Leukämiezelllinien, RS4;11, SEM, REH, CEM, Jurkat und MOLT-4, wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. Die Kultivierung dieser ALL-Zelllinien erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung und unter Berücksichtigung der durch die DSMZ empfohlenen Zelldichten und Medien (Tabelle 3). Zweimal pro Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um eine kontinuierliche Proliferation zu gewährleisten. Für Experimente wurde aus diesen Kulturen ein Aliquot entnommen, abzentrifugiert (180 x g, 10 min, 4°C) und die gewünschte Zelldichte in frischem Medium eingestellt. Alle Arbeitsschritte an den Zellen wurden mit sterilen Werkzeugen und sterilen Lösungen in der keimfreien Atmosphäre einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Als Positivkontrolle für Untersuchungen zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs dienten neuronale ReNcell VM-Zellen [141] im proliferierenden Status sowie die Kolonkarzinomzelllinie SW480 [142]. Die Kultivierung sowie Proteinisolierung aus ReNcell VM-Zellen wurde im Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration durchgeführt, während SW480-Protein-Aliquots von der Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt wurden.

Tabelle 3: Karyotypen und Kulturbedingungen der verwendeten ALL-Zelllinien.

Zelllinie	Erkrankung	Karyotyp*	Verdopplungszeit	Aussaatdichte	opt. Kultivierungsdichte	Erntedichte	Medium**	FKS
RS4;11	humane B-ALL	47/48<2n>X/XX, +8, +18, t(4;11)(q21;q23), i(7q) - Seitenlinie ohne +8/18	50 h	1,2 x 10 ⁶ /ml	3,0 x 10 ⁶ /ml	4,0 x 10 ⁶ /ml	alpha-MEM	10%
SEM	humane B-ALL	45(40-46)<2n>XX, -13, t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14)	30 h	0,8 x 10 ⁶ /ml	2,5 x 10 ⁶ /ml	4,0 x 10 ⁶ /ml	Iscove's MEM	10%
REH	humane B-ALL	46(44-47)<2n>X, -X, +16, del(3)(p22), t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3), inv(12)(p13q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) - Seitenlinie mit inv(5)der(5)(p15q31),+18	50 - 70 h	2,6 x 10 ⁶ /ml	4,0 x 10 ⁶ /ml	5,0 x 10 ⁶ /ml	RPMI 1640	10%
CCRF-CEM	humane T-ALL	90(88-101)<4n>XX, -X, -X, +20, +20, t(8;9)(p11;p24)x2, der(9), del(9)(p21-22), del(9)(q11q13-21)x2 - Seitenlinie mit +5, +21, add(13)(q3?3), del(16)(q12)	24 - 30 h	0,5 x 10 ⁶ /ml	1,5 x 10 ⁶ /ml	3,0 x 10 ⁶ /ml	RPMI 1640	10%
Jurkat	humane T-ALL	87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 - Seitenlinie mit zusätzlich der(5)t(5;10)(q11;p15),	25 - 35 h	0,5 x 10 ⁶ /ml	1,5 x 10 ⁶ /ml	3,0 x 10 ⁶ /ml	RPMI 1640	10%
MOLT-4	humane T-ALL	98(94-101)<4n>XXYY, +6, +7, +8, +8, +17, +20, del(6)(q16)x2, der(7)t(7;7)(p15;q11)x2	40 h	0,5 x 10 ⁶ /ml	1,5 x 10 ⁶ /ml	3,0 x 10 ⁶ /ml	RPMI 1640	20%

*die Angaben zum Karyotypen entstammen den Zelllinien-Datenblättern (DSMZ)

**allen Medien wurde 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt

2.1.2 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Die Anzahl lebender Zellen wurde vor jedem Experiment und regelmäßig bei den Mediumwechseln überprüft. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit einem definierten Volumen Trypanblau gemischt und in die Neubauerzählkammer (0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm² Volumen) pipettiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl berechnet.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung der folgenden Formel:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{ Zellzahl aller Quadrate} / 4 &= \text{Mittelwert der Zellzahl / Quadrat} \\ \text{Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} &= \text{Zellen / ml} \\ \text{Zellen / ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} &= \text{Gesamtzellzahl} \end{aligned}$$

Die lebenden, ungefärbten Zellen sind deutlich von den toten, blau-angefärbten Zellen zu differenzieren.

2.1.3 Behandlung der ALL-Zelllinien mit Liganden und Antagonisten des Wnt/ β -Catenin- und PI3K/Akt-Signalwegs

Für die Studien zur Signalwegsaktivierung und -Interaktion wurden die Zelllinien entsprechend der durch die DSMZ-empfohlenen Zelldichten (Tabelle 3, opt. Kultivierungsdichten) eingesät und mit folgenden Substanzen behandelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Liganden und Inhibitoren.

Substanz	Wirkmechanismus	verw. Konzentration*
Wnt3a	aktiviert Wnt-Signalweg über FZD-Bindung	50 - 500 ng/ ml (250 ng/ml)
DKK-1	inhibiert Wnt-Signalweg über LRP-Bindung	50 - 500 ng/ ml
FLT3 Ligand	aktiviert PI3K/Akt-Signalweg über RTK-Bindung	10 - 100 ng/ ml (50 ng/ml)
LY294002	inhibiert PI3K-Signalweg über PI3K-Hemmung	25 - 50 µM (50 µM)

*angegebene Intervalle entsprechen den getesteten Konzentrationen im Rahmen von Vorversuchen zur Identifizierung geeigneter Arbeitskonzentrationen. Arbeitskonzentrationen sind in Klammern angegeben.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5 h – 48 h) und je nach Fragestellung wurden die Zellen zur Gewinnung von RNA (siehe 2.2.1.1) bzw. Protein (siehe 2.3.1) lysiert oder die Zellen auf Objektträgern fixiert (siehe 2.1.6).

2.1.4 *Phenol/Guanidin-basierte Lyse von humanen Leukämiezellen*

Zur Gewinnung von Zelllysaten zum Zwecke der RNA-Isolierung wurden $2 - 8 \times 10^6$ Zellen in 1 ml PBS (*Phosphate buffered saline*) resuspendiert und durch Zentrifugation (5 min, 2000 x g, Raumtemperatur (RT)) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ein weiteres Mal zentrifugiert (2 min, 2000 x g, RT). Nachdem der verbleibende Überstand vorsichtig abgenommen wurde, wurde das Pellet zur Herstellung der Zelllysate in 700 µl *QIAzol*® (QIAGEN®), auf Basis von Phenol/Guanidinthiocyanat, resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

2.1.5 *RIPA-basierte Lyse von humanen Leukämiezellen*

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Zelllysaten zum Zwecke der Proteinisolierung wurden $5 - 15 \times 10^6$ Zellen benötigt, die in 1 ml PBS resuspendiert wurden. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 x g, RT) wurde der Überstand vom Zellpellet getrennt und verworfen. Einer erneuten Zentrifugation (2 min, 2000 x g, RT) folgte die Resuspension des Zellpellets in 80 – 150 µl des 1 x konzentrierten RIPA-Puffers. Dieser wurde aus Verdünnung einer 10 x konzentrierten RIPA-Stocklösung (Cell Signaling Technology®) unter Zusatz des entsprechend verdünnten 100 x konzentrierten *Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktails* (Cell Signaling Technology®) angesetzt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der RIPA-Zelllysate bei -20°C.

2.1.6 *Herstellung von Zytospins*

Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen (180 x g, 10 min, 4°C) und eine Zelldichte von $3 - 5 \times 10^4$ Zellen / 200 µl PBS eingestellt. Anschließend erfolgte das Aufbringen der Zellen auf Objektträger mit Hilfe einer Zytospinzentrifuge (CytoSpin III, Shandon™). Dafür wurden Shandon™ Einfach-Cytofunnel™ (Thermo Scientific™) an sauberen Objektträgern befestigt und mit 200 µl Zellsuspension bestückt. Die Zentrifugation zum Aufbringen der Zellen erfolgte bei 70 x g für 10 min. Die Objektträger wurden im Anschluss etwa 10 min luftgetrocknet und zur Fixierung der Zellen 10 min in Methanol inkubiert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte einzeln in Alufolie verpackt bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

2.1.7 *Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation*

Die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ist eine Separationsmethode zur Auftrennung der Blutbestandteile entsprechend ihrer spezifischen Dichten. Zur Trennung eignen sich wässrige Lösungen mit erhöhter Dichte, z.B. das Sucrose-haltige Trennmedium Ficoll. Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichten durch die Ficollschicht und bilden das Pellet. Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase verbleiben, reichern sich die Lymphozyten und Monozyten in der weißlich erscheinenden Interphase zwischen Plasma und Ficoll an.

Zur Anreicherung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Vollblut oder Knochenmark wurde zunächst die Blutprobe zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. Anschließend wurde das identische Volumen Ficoll (Biocoll, Biochrom) vorsichtig mit der verdünnten Blutprobe überschichtet. Während eines Zentrifugationsschritts (12 min, 1140 x g, 4°C, ohne Bremse) erfolgte die Auftrennung der Blutzellen in verschiedene Schichten entsprechend ihrer spezifischen Dichten. Der Interphasering wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 ml PBS versetzt. In zwei anschließenden Waschschritten (Zentrifugation, 10 min, 200 x g, 4°C) wurden die Zellen von Ficoll-Rückständen gereinigt.

2.1.8 *Isolierung von B- bzw. T-Lymphozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts mittels magnetischer Beads*

Das dieser Anreicherung zugrunde liegende Prinzip basiert auf der Kopplung von spezifischen Antikörpern an Magnetpartikel. Über eine Säule werden die Magnetpartikel-beladenen Antikörper, inklusive der gebundenen Antigene auf der Zelloberfläche, festgehalten und anschließend in einer separaten Fraktion eluiert. Dadurch wird eine Trennung von spezifischen Zelltypen aus einem Zellgemisch über ihre spezifischen Oberflächenmarker ermöglicht.

Zur Anreicherung von B- und T-Zellen wurden zunächst mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.1.7) mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut vier bis acht gesunder Personen (gepoolt, Übersicht der *Pools* siehe Tabelle 21) isoliert. Das Zellpellet wurde anschließend in vier Volumenteilen MACS-Separationspuffer (MSP bestehend aus PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % BSA) und einem Volumenteil MicroBead (20 µl MicroBead / 1×10^7 Zellen) resuspendiert und 15 min im Dunkeln bei 4 - 8°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ablösung von ungebundenem Antikörper durch die Zugabe von MSP in einem 10 – 20 fachen Volumen der Probe (= MSP + MicroBead) und einer Zentrifugation bei 200 x g und 4°C für 12 min. Das Pellet wurde je nach Größe in 1 – 3 ml MSP resuspendiert und mit dem autoMACS® (Miltenyi Biotec) unter Verwendung des Programms `Possel d` einer Separation unterzogen. Die entstandene Negativfraktion wurde erneut einer Separation

unterzogen um die Ausbeute der anzuhäufenden Zelltypen zu erhöhen. Mit Hilfe dieser Methodik war es möglich unter Verwendung des CD19-MicroBeads (Miltenyi Biotec) CD19-positive Zellen (B-Zellen) und unter Verwendung des CD3-MicroBeads (Miltenyi Biotec) CD3-positive Zellen (T-Zellen) anzureichern. Nach der Separation wurde die Zellzahl der Positivfraktion bestimmt, die Reinheit der Isolate mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft und Zelllysate für die anschließende Isolierung von Protein und RNA hergestellt. Die Reinheit betrug in allen Kontrollzelltypen > 80 %. Die benötigte Zellzahl an B- und T-Zellen zur Gewinnung von Protein und RNA für die Expressionsanalysen betrug:

RNA: 1 - 5 x 10⁶

Protein: 10 - 25 x 10⁶

Eine Übersicht aller durchgeführten Separationen zur Gewinnung von B- und T-Zellen sind unter Angabe ihrer Zell-Ausbeute und Reinheit im Anhang dargestellt (Tabelle 21).

2.1.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Zellen anhand ihrer spezifischen Lichtstreuungseigenschaften. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert und passieren in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Fluorochrome angeregt, zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel (3° - 10°) gestreute Licht wird als Vorwärtstreulicht bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtstreulicht bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Das von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht wird auf photosensitive Detektoren übertragen.

Nach Isolierung mononukleärer Zellen aus *de novo*-Material gesunder Probanden wurde die Reinheit der Probe durchflusszytometrisch mit Hilfe des BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) bestimmt. Auch zur Bestimmung des Blastenanteils in einer Blut- oder Knochenmarkprobe von ALL-Patienten wurde die Methodik der Durchflusszytometrie eingesetzt. Je Ansatz wurden 1 x 10⁵ Zellen in 100 µl PBS gelöst und mit 10 µl Antikörper (Tabelle 6) für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 mal mit PBS gewaschen um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Vor der Messung wurde eine Kompensation für die verwendeten Fluorochrome durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der BD CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences). Alle verwendeten Antikörper zur Überprüfung der Reinheit der verschiedenen Fraktionen sind Tabelle 5 dargestellt. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper zur Ermittlung des Blastenanteils von ALL-Patienten sind in Tabelle 6 dargestellt. Weitere Details zu den verwendeten

Antikörpern, wie Klonbezeichnung, Produktnummer und Hersteller sind dem Materialteil zu entnehmen (Anhang, 7.1.5).

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für den Nachweis der Reinheit von B- und T-Zellen.

FITC Antikörper	PE Antikörper	Nachweis Zelltyp
<i>Probe vor Isolierung der B- und T-Lymphozyten</i>		
Maus IgG1	murin IgG1	Negativkontrolle
Maus IgG1	human CD3	T-Zellen (Kompensation PE)
human HLA-DR	murin IgG1	zytotoxische T-Zellen (Kompensation FITC)
human CD45	human CD11c	Leukozyten / Monozyten
human CD14	human CD3	Monozyten + Granulozyten / T-Zellen
human CD19	-	B-Zellen
human CD19	human CD3	B-Zellen / T-Zellen
<i>Probe nach Isolierung der B-Lymphozyten: CD19-Positivfraktion</i>		
human CD19	human CD3	B-Zellen / T-Zellen
<i>Probe nach Isolierung der B-Lymphozyten: CD19-Negativfraktion</i>		
Maus IgG1	murin IgG1	Negativkontrolle
human CD19	human CD3	B-Zellen / T-Zellen
<i>Probe nach Isolierung der T-Lymphozyten: CD3-Positivfraktion</i>		
human CD19	human CD3	B-Zellen / T-Zellen
<i>Probe nach Isolierung der T-Lymphozyten: CD3-Negativfraktion</i>		
Maus IgG1	murin IgG1	Negativkontrolle
human CD19	human CD3	B-Zellen / T-Zellen

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die Charakterisierung von ALL-Primärzellen.

FITC Antikörper	PE Antikörper	Nachweis Zelltyp
Maus IgG1	murin IgG1	Negativkontrolle
Maus IgG1	human HLA-DR	zytotoxische T-Zellen (Kompensation PE)
human CD45	murin IgG1	Leukozyten (Kompensation FITC)
human CD2	human CD19	B-Zellen / T-Zellen

2.1.10 WST-1 Stoffwechselaktivitätstest

Als Maß für die Viabilität von Zellen wurde deren metabolische Aktivität mit Hilfe des WST-1 (*water-soluble tetrazolium salt-1*) Tests gemessen. Das hellrote Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen lebender Zellen zum dunkelroten Formazan reduziert. Dieser Farbumschlag lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmen, wobei

die Extinktion mit der Aktivität der mitochondrialen Enzyme und somit mit der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen korreliert.

Der WST-1 Proliferationstest wurde in einer 96-Mikrotiterplatte in Triplikaten und an zwei Zeitpunkten durchgeführt. Dazu wurde eine definierte Zellzahl von $0,05 \times 10^6$ Zellen/ 150 µl Medium in jedes Well pipettiert und die Platte bis zur Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zugabe des Tetrazoliumsalzes WST-1, 15 µl/ Well, erfolgte jeweils 48 h und 72 h nach Ansetzen des Versuchs. Es erfolgte eine zwei- bis dreistündige Inkubation der Zellen, bevor die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 750 nm) photometrisch gemessen wurde (GloMax®-Multi Detection System, Promega). Zur Ermittlung des Blindwerts diente reines Medium, das ebenfalls mit WST-1 versetzt wurde. Der Blindwert wurde vom Mittelwert der in den unterschiedlichen Ansätzen ermittelten Absorptionswerte subtrahiert um die metabolische Aktivität zu bestimmen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Genexpressionsanalyse

Eine sehr sensitive Methode zum Nachweis der Genexpression ist die qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), die eine Kopplung von reverser Transkription und einer im Anschluss durchgeführten PCR darstellt. Durch die Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen an die DNA während der PCR, kann die Amplifikation des PCR-Produkts in Echtzeit dargestellt werden. Der Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird als Ct (*Cycle threshold*)-Wert bezeichnet. Der Ct-Wert wird dabei umso eher erreicht, umso mehr DNA-Moleküle zu Beginn der Amplifikation vorliegen, da eine Proportionalität von Fluoreszenzsignal zu Produktakkumulation besteht. Die Echtzeit-Detektion des Fluoreszenzsignals basiert auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), bei dem Energie von einem angeregten Farbstoff, dem Donor am 3'-Ende der qPCR Sonde, auf einen zweiten Farbstoff, dem mit dem 5'-Ende gekoppelten Akzeptor, übertragen wird. In der Elongationsphase wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde gespalten. Durch Aufhebung der räumlichen Nähe von Donor- und Akzeptorfarbstoff, wird der FRET aufgehoben und es kommt zur Fluoreszenzemission.

2.2.1.1 RNA-Isolierung

Für die Analyse der miR-Expression erfolgte die RNA-Isolierung unter Verwendung des *miRNeasy Mini Kits* (QIAGEN®) nach Herstellerangaben. Dieses Kit ermöglicht die Gewinnung von Gesamt-RNA, einschließlich sehr kleiner RNA-Moleküle, durch Verwendung von Silica-Membranen sehr geringer

Porengröße. Die RNA-Präparation erfolgte aus in *QIAzol*®-Reagent-homogenisierten Zelllysaten über eine Anreicherung einer miR-Fraktion. Eine DNase-Behandlung gewährleistete die Eliminierung von DNA-Verunreinigungen, was für die anschließenden Experimente essentiell war.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop™ ND-1000, peqlab) bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase kann entlang einer RNA-Matrize ausgehend von einem Primer komplementäre einzelsträngige cDNA (*copy DNA*) erzeugt werden, welche anschließend als Template in der PCR eingesetzt wird.

Für die Analyse der miR-Expression wurden im Rahmen der cDNA-Synthese Gen-spezifische Primer (*TaqMan*™ *miRNA Assays*) sowie das *TaqMan*™ *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die *TaqMan*™ *miRNA Assays* zeichnen sich durch spezielle Stem-Loop-Primer für die Reverse Transkription aus, welche einerseits sehr spezifisch für die gewünschte miR sind und andererseits das miR-Transkript verlängern und dieses so für die anschließende PCR zugänglich machen. Als endogene Kontrolle diente die kleine RNA RNU48 (*Small nucleolar RNA, C/D box 48*), welche, analog zu den miRs, auch über Gen-spezifische Primer angereichert und verlängert wurde.

Für die real-time PCR-basierte Analyse der universellen Wnt-Zielgene *CCND1*, *LEF1* und *MYC* wurde die cDNA mit Hilfe des *SuperScript*™ *II Reverse Transcriptase Kits* (Invitrogen™) hergestellt. Hierfür wurde das Herstellerprotokoll modifiziert, wie in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: cDNA-Synthese nach modifiziertem *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* - Protokoll.

Komponenten	Volumen
Gesamt-RNA (10 ng – 5 µg)	26 µl
Oligo(dT)12-18 Primer (500 µg/ml)	1 µl
→ Inkubation 10 min bei 70 °C	
+ 5 x First-Strand Buffer	8 µl
+ DTT (0,1 M)	2 µl
+ dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)	2 µl
+ SuperScript II (200 U/µl)	1 µl
→ Inkubation 1 h bei 42 °C	
→ Hitzeinaktivierung 10 min bei 95 °C	

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der PCR kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des in der Reversen Transkription erzeugten cDNA-Moleküls durch eine hitzestabile Polymerase. Unter Verwendung von Desoxyribonukleotiden verlängert (Elongation) dieses Enzym die an die, durch Denaturierung einsträngig gemachte, Matrize angelagerten Primer zum DNA-Doppelstrang. Diese mehrere Zyklen umfassende wiederholte Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation ermöglicht so eine exponentielle Vervielfältigung des Matrizenstrangs.

Für die PCR nach erfolgter Reverser Transkription zum Nachweis spezifischer miRs und Wnt-Zielgene wurde die synthetisierte cDNA in eine 96-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit DNA-Polymerase (enthalten in 2 x Master Mix), spezifischen *TaqMan™*-Sonden und -Primern sowie Wasser versetzt. Die verwendeten Volumenangaben sind in Tabelle 8 dokumentiert.

Tabelle 8: qPCR-Ansatz zum Expressionsnachweis spezifischer miRs und Wnt-Zielgene.

Komponente	Volumen	
	miR	Wnt-Zielgene
cDNA	1,33 µl	2,00 µl
Master Mix (2 x)	10,00 µl	10,00 µl
TaqMan™ Primer-Sonden-Mix (20 x)	1,00 µl	1,00 µl
H ₂ O, Nuklease-frei	7,67 µl	7,00 µl
Total	20,00 µl	20,00 µl

Die Messung der relativen Genexpression erfolgte in Triplikaten. Ein mit Wasser (statt cDNA) bestückter Ansatz pro verwendeten Primer diente als Negativkontrolle. Die definierten Temperaturbedingungen der qPCR sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: qPCR-Protokoll unter definierten Temperaturbedingungen.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Start-Temperatur	50 °C	2 min	1 x
Enzym-Aktivierung	95 °C	10 min	1 x
PCR			
• Denaturierung	95 °C	15 s	40 x
• Primer-Anlagerung, Elongation	60 °C	1 min	

2.2.1.4 Die Quantifizierung der relativen Genexpression mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Bei der relativen Quantifizierung handelt es sich um die Bestimmung der DNA-Menge in einer unbekannten Probe im Verhältnis zur DNA-Menge in Kontrollzellen. Die unbekannte Menge der Zielsequenz wird semiquantitativ ermittelt, d.h. die Amplifikation einer endogenen Kontrolle wird zur Zielsequenz ins Verhältnis gesetzt. Als endogene Kontrolle wird ein sogenanntes Haushaltsgen (*Housekeeping Gen*) verwendet, welches sich durch eine ubiquitäre und gleichmäßige Expression in allen Zellen auszeichnet. Zur Ermittlung der Expression von Wnt-Zielgenen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als endogene Kontrolle verwendet. Für die Bestimmung der relativen Expression von miRs wurde die kleine nukleäre RNA RNU48 als Referenz-RNA verwendet, da diese hinsichtlich ihrer Molekülgröße vergleichbar mit denen von miRs ist und dadurch sowohl RNA-Isolierung als auch *Stem-Loop*-RT-PCR ähnlich effizient wie die der miRs sind.

Die relative Menge der mRNA-Transkripte in den zu analysierenden Zellen wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Formel unter Berücksichtigung der spezifischen PCR-Effizienzen ermittelt. Dabei ist darauf zu achten, dass die PCR-Effizienzen des zu untersuchenden Zielgens und des Haushaltsgens ähnlich sind. Die Effizienz einer PCR-Reaktion liegt in der Regel zwischen 1,7 und 2 und hängt unter anderem von der Amplifikatlänge, vorhandenen Sekundärstrukturen oder dem GC-Gehalt im Template ab [143].

Zur Ermittlung der PCR-Effizienzen wurde eine Verdünnungsreihe (RNA in Nuklease-freiem Wasser gelöst) hergestellt und jeweils 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng und 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben und für die nachfolgende PCR eingesetzt. Die ermittelten C_t -Werte wurden grafisch gegen die Menge des für die Reaktion eingesetzten Templates aufgetragen. Die Effizienz der Reaktion wurde über den Anstieg der Regressionsgeraden mit der folgenden Formel ermittelt:

$$E = 10^{(-1)/m}$$

* E = Effizienz; m = Anstieg

Die ermittelten PCR-Effizienzen der unterschiedlichen Sonden sind in Abbildung 2 dargestellt.

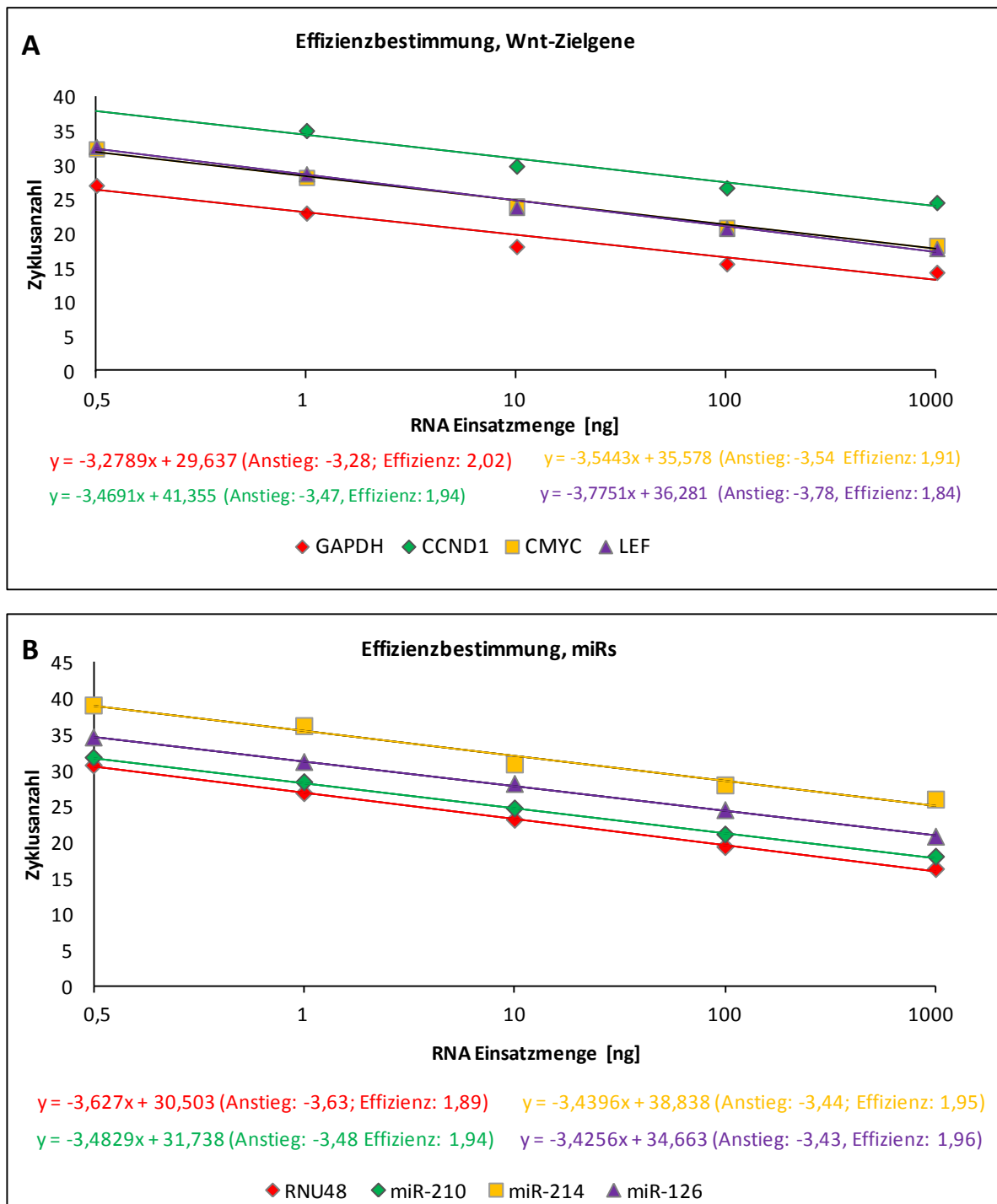


Abbildung 2: qPCR-Effizienzen von Wnt-Zielgenen (A) und miRs (B).

Anhand von Verdünnungsreihen erfolgte die Bestimmung der qPCR-Effizienzen.

Unter Berücksichtigung der ermittelten PCR-Effizienzen für jedes Gen bzw. jede miR wurde mit Hilfe der modifizierten $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Formel die relative Genexpression nach folgender Formel durch das Programm REST-384 Version 2 (Relative Expression Software Tool, <http://www.gene-quantification.de>) berechnet:

$$\text{Relative Expression} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta C_t \text{ Zielgen (MW Kontrollzellen} - \text{MW Tumorzellen)}}}{E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta C_t \text{ Referenzgen (MW Kontrollzellen} - \text{MW Tumorzellen)}}$$

2.2.2 Chromosomenanalyse von ALL-Zellen

Die zytogenetische Analyse der verwendeten Zelllinien und Primärzellen erfolgte an durch Colcemid-Behandlung gewonnenen Methaphasen [144] durch das Hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock (ZIM III-Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Universitätsmedizin Rostock (UMR)).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Fraktionierung von Proteinen

Zur Separierung von Proteinen in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion wurde die REAP (*rapid, efficient and practical*)-Methode nach Suzuki *et al.* verwendet, die auf dem Aufschluss zunächst der Zytoplasmamembran und anschließend der Kernmembran basiert [145]. Die Durchführung einer Zentrifugation bei einer sehr hohen g-Zahl ($> 16.000 \times g$) zwischen den verschiedenen Aufschluss-Schritten ermöglicht die Trennung der Kerne vom Zytoplasma aufgrund ihrer unterschiedlichen Schwebedichten.

Zunächst wurden die Zellen ($4 - 7 \times 10^6$) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen, das entstandene Zellpellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer ersten Zentrifugation bei $16.000 \times g$ für 10 s wurde der entstandene Überstand verworfen und das Zellpellet in 900 μ l kaltem PBS-NP40 (0,1 %) resuspendiert. Ein Drittel (300 μ l) des Proteinlysats wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und beinhaltet sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine (Gesamtfraktion). Die übrigen Zellen wurden erneut zentrifugiert ($16.000 \times g$ für 10 s) und der Überstand, welcher die zytoplasmatischen Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um verbliebene Zellkerne im Überstand zu

eliminieren, folgte eine zweite Zentrifugation (16.000 x g für 10 s). Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (= Zytoplasma-Fraktion). Das entstandene Pellet wurde verworfen. Das Zellpellet der vorigen Zentrifugation wurde in 1 ml kalten PBS-NP40 resuspendiert und gewaschen (16.000 x g für 10 s). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die nukleäre Fraktion zurückgestellt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration (siehe 2.3.1) wurde ein geringes Volumen der Gesamt- und Zytoplasma-Fraktion entnommen. Die unterschiedlichen Fraktionen wurden wie folgt für die anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorbereitet:

Gesamtfraktion: Die Probe wurde zu gleichem Teil mit 2 x Probenpuffer versetzt, mittels Ultraschallbehandlung (2 x 5 s; SONOPULS HD 2070, Bandelin) lysiert und 8 min bei 96 °C aufgeköcht.

Zytoplasmatische Fraktion: 4 Volumenteile Probe wurden mit 1 Volumenteil 5 x Probenpuffer (Tabelle 10) versetzt und 8 min bei 96 °C aufgeköcht.

Nukleäre Fraktion: Das Pellet wurde in 1 x Probenpuffer (etwa Volumen wie Gesamtfraktion + Probenpuffer) aufgenommen, mittels Ultraschallbehandlung (2 x 5 s; SONOPULS HD 2070, Bandelin) lysiert und 8 min bei 96 °C aufgeköcht.

Die Herstellung des Probenpuffers ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Herstellung von 5 x Probenpuffer für Western Blot.

Substanz	Konzentration
TRIS	50 mM
SDS	2,0 % w/v
Glycerol	5,0 % v/v
β-Mercaptoethanol	5,0 % v/v
Bromphenolblau	0,2 mg/ ml

* 2 x Probenpuffer sowie 1 x Probenpuffer wurden durch Verdünnung des 5x Probenpuffers angesetzt

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Marion M. Bradford [146] mit Hilfe des *Bio-Rad Protein Assays* (Bio-Rad) durchgeführt. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffs *Comassie Brilliant Blue* an aromatische Proteinseitenketten und einen damit verbundenen Farbumschlag.

Die in RIPA lysierten Zellen (vgl. 2.1.5) wurden auf Eis aufgetaut und mittels Ultraschallbehandlung (2 x 8 s; SONOPULS HD 2070, Bandelin) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (13850 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und wenige Mikroliter dieses Proteinlysats dienten der Herstellung von wenigstens zwei unterschiedlichen Verdünnungen (beispielsweise 1:200 und 1:400, in 800 µl Gesamtvolumen). Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Bradford-Farbstoffkonzentrat und nach 5 minütiger Inkubation wurden die Proteinverdünnungen in

Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert und bei 595 nm photometrisch vermessen (GloMax® Multi Detection System, Promega). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors und anhand des Vergleichs zu einer BSA-Standardreihe (von 0 – 25 µg/ml), welche aus Proben bekannter Proteinkonzentrationen erstellt wurde.

Die Proteinproben wurden für die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet, indem sie mit 2 x konzentriertem Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

In Polyacrylamidgelen erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte. Dafür wurden die *Criterion™ TGX™*-Gradientengele der Firma Bio-Rad verwendet. Diese Gele ermöglichen eine Protein-Auftrennung über einen großen Molekülmassenbereich. Nachdem die Gele in die Laufkammer eingespannt wurden, erfolgte das Beladen der Taschen mit 20 - 100 µg Protein. Als Größenstandard diente *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* (Bio-Rad). Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (Tabelle 11) bei einer Spannung von 120 - 180 V für etwa 90 min.

Tabelle 11: Herstellung von Elektrophoresepuffer.

Substanz	Konzentration
TRIS	0,025 M
Glycin	0,2 M
SDS	3,5 mM

2.3.4 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren dient dem Transfer elektrophoretisch-aufgetrennter Proteine auf ein Trägermaterial, auf welchem im Anschluss ein Proteinnachweis mittels Antikörperbehandlung durchgeführt wird.

Der Transfer der Proteine erfolgte auf *Trans-Blot® Turbo™ Midi* PVDF-Membranen (Bio-Rad), welche eingebettet in Puffer-getränktem Filterpapier in den Blotter *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System* (Bio-Rad) platziert wurden. Das Blotting erfolgte bei 2,5 A für 15 min im Transfergerät (*Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System*, Bio-Rad).

Eine Färbung der Membranen mit Ponceau-Lösung wurde zum Nachweis von gleichmäßig aufgetrennten und geblotteten Protein durchgeführt.

2.3.5 Spezifischer Antikörpernachweis und Visualisierung der Proteine

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch-TBST (*Tris buffered saline with Tween 20*) inkubiert um Bindungsstellen zu sättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verringern. Einer Inkubation der Membranen mit spezifischen Primärantikörpern für 1 h bei RT folgten drei 5 minütige Waschschrte mit TBST (Tabelle 12) und eine Sekundärantikörperbehandlung für ebenfalls 1 h bei RT. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch Waschen mit TBST entfernt (3 x 5 min). Zum Nachweis des an den sekundären Antikörper-gebundenen Enzyms Meerrettichperoxidase wurde das *Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare) verwendet. Die Peroxidase oxidiert das im ECL-Reagenz enthaltene *Lumigen®-TMA-6* und das freigesetzte Lichtsignal kann anschließend mittels CCD-Kamera (Fotodokumentationssystem Kodak Imager) erfasst werden.

Alle für Western Blot-Versuche verwendeten primären und sekundären Antikörper sind unter Angabe der jeweils genutzten Verdünnungen in Tabelle 13 und

Tabelle 14 dargestellt. Weitere Produkt-Details der verwendeten Antikörper sind dem Materialverzeichnis zu entnehmen (Anhang, 7.1.5).

Tabelle 12: Herstellung von TBST.

Substanz	Konzentration
Natriumchlorid	0,15 M
TRIS	0,01 M
Triton X100	0,0005 % v/v

Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper (Western Blot).

Primärantikörper	Klon	Wirt	Größe	Verdünnung
<i>PI3K/Akt-Signalweg</i>				
PI3 Kinase p85	Polyklonal	Kaninchen	85 kDa	1:1000 in Magermilch
PI3 Kinase p110	Monoklonal	Kaninchen	110 kDa	1:1000 in Magermilch
pAkt (Thr308)	Monoklonal	Kaninchen	60 kDa	1:500 in Magermilch
pAkt (Ser473)	Monoklonal	Kaninchen	60 kDa	1:500 in Magermilch
Akt	Polyklonal	Kaninchen	60 kDa	1:1000 in Magermilch
p4EBP1 (Ser65)	Monoklonal	Kaninchen	15-20 kDa	1:500 in Magermilch
p4EBP1 (Thr70)	Polyklonal	Kaninchen	15-20 kDa	1:500 in Magermilch
4EBP1	Polyklonal	Kaninchen	15-20 kDa	1:500 in Magermilch
pp70 S6 Kinase (Thr389)	Monoklonal	Kaninchen	70, 85 kDa	1:500 in Magermilch
p70 S6 Kinase	Monoklonal	Kaninchen	70, 85 kDa	1:500 in Magermilch
mTOR	Monoklonal	Kaninchen	289 kDa	1:1000 in BSA
pPTEN (Ser380)	Polyklonal	Kaninchen	54 kDa	1:1000 in BSA
PTEN	Monoklonal	Kaninchen	54 kDa	1:1000 in BSA

Wnt/ β -Catenin-Signalweg

pLRP6 (Ser1490)	Polyklonal	Kaninchen	180, 210 kDa	1: 1000 in BSA
LRP6	Monoklonal	Kaninchen	180, 210 kDa	1: 1000 in BSA
Axin	Polyklonal	Kaninchen	110 kDa	1: 1000 in BSA
CK1 α	Polyklonal	Ziege	38 kDa	1: 500 in BSA
pGSK3 β (Ser9)	Monoklonal	Kaninchen	46 kDa	1:1000 in Magermilch
GSK3 β	Monoklonal	Kaninchen	46 kDa	1:1000 in Magermilch
np- β -Catenin	Monoklonal	Kaninchen	92 kDa	1:500 in Magermilch
β -Catenin	Monoklonal	Kaninchen	92 kDa	1:1000 in Magermilch
Tcf4	Monoklonal	Kaninchen	58, 79 kDa	1:1000 in Magermilch

endogene Kontrolle

GAPDH	Monoklonal	Maus	37 kDa	1:20000 in Magermilch
Histon H3	Polyklonal	Kaninchen	17 kDa	1:25000 in Magermilch

Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper (Western Blot).

Sekundärantikörper	Klon	Wirt	gebundenes Enzym	Verdünnung
anti-Kaninchen IgG	Polyklonal	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:1000 in Magermilch/BSA
anti-Maus IgG	Polyklonal	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:20000 in Magermilch

Der Nachweis von Proteinen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen (3.1.1) erfolgte durch Herrn Dr. Rayk Hübner des Albrecht-Kossel-Instituts für Neuroregeneration.

2.3.6 Immunfluoreszenz

Die Lokalisation zellulärer Proteine kann mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Form der Immunfluoreszenz angewendet. Bei dieser erfolgt der Nachweis über einen primären Antikörper, der in einem zweiten Schritt durch einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper gebunden und detektiert wird.

Die bei Raumtemperatur aufgetauten Zytospins wurden 10 min in Methanol fixiert. Nachdem das anhaftende Methanol verdunstet war, wurden in einer einstündigen Blockierung in PBS-BSA (0,01 %) freie Proteinbindungsstellen mit BSA (bovines Serumalbumin) abgesättigt. In einer feuchten Kammer erfolgte nun die 30 minütige Inkubation der Zytospins mit dem primären Antikörper. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST (*Phosphate buffered saline with Tween 20*) zu je 20 min wieder entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde für 20 min (feuchte, dunkle Kammer) durchgeführt und durch dreimaliges Waschen zu je 20 min mit PBST (in mit Alufolie abgedunkelter Glasküvette auf dem Schüttler) abgestoppt. Nach einem abschließenden Waschschritt in PBS für 5 min, wurden die Zytospins in Eindeckmedium

(*Roti®-Mount FluorCare DAPI*, Roth) eingebettet. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper sind in Tabelle 15 dargestellt. Weitere Produkt-Details der verwendeten Immunfluoreszenz-Antikörper sind in den Material-Tabellen gelistet (Anhang, 7.1.5).

Tabelle 15: Verwendete Antikörper (Immunfluoreszenz).

Antikörper	Klon	Wirt	gebundenes Fluorochrom	Verdünnung
Primärantikörper				
β -Catenin	Polyklonal	Kaninchen	-	1:100 in PBS-BSA
Sekundärantikörper				
anti-Kaninchen IgG	Polyklonal	Ziege	Alexa-Fluor488	1:400 in PBS-BSA

Mikroskopie

Die Mikroskopie der gefärbten Objektträger erfolgte mit dem konfokalem Fluoreszenzmikroskop *FluoView™ FV10i* (Olympus). Durch Kombination des 60x-Objektivs mit der integrierten konfokalen Zoomtechnik wurden Vergrößerungsbereiche von bis zu 180x gewählt.

Quantifizierung des Fluoreszenzsignals

Zur Quantifizierung des in der Immunfluoreszenz erhaltenen Fluoreszenzsignals wurden zunächst Bildstapel (*z-stacks*) von Zytoplasma und Zellkernen der ALL-Zellen mit dem *FluoView™ FV10i* (Olympus) angefertigt. Dabei betrug der Abstand zwischen den einzelnen Bildstapel 0,75 μ m. Anhand des über DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbten Zellkerns erfolgte die Auswahl eines zentralen Bildstapels der aufgenommenen Sequenz. Dieser stellte einen repräsentativen Querschnitt durch die Zelle dar. Pro Bild wurden sowohl Zytoplasma als auch Zellkern dreier repräsentativer Zellen manuell determiniert und diese Flächenelemente als *Region of interest* (ROI) markiert. Es erfolgte die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität für jedes Flächenelement mit Hilfe der produkteigenen Software (*Fluoview™ FV10i*, Olympus). Die ermittelten Werte dienten der Berechnung eines Mittelwerts. Die Mittelwerte aller unabhängigen Experimente wurden grafisch zusammengefasst. Es erfolgte die Darstellung der relativen Änderung der zytoplasmatischen und nukleären β -Catenin-Spiegel der Wnt3a-Ansätze, wobei die Normierung anhand der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollzellen (= 100 %) erfolgte.

2.4 Statistik

Die in der Arbeit dargestellten Diagramme wurden mit Hilfe von Excel 2007 erstellt. Dabei wurden die Mittelwerte mindestens zweier unabhängiger Versuche \pm Standardabweichung dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz bei $n \geq 3$ erfolgte durch zweiseitigen t-Test mittels Excel. Kaplan-Meier-Überlebenskurven sowie der Chi-Quadrattest nach Pearson zur Ermittlung der Signifikanzen von untersuchten Überlebensgruppen wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics Version 22 erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Studien zur Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen

3.1.1 Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Zum Nachweis des Aktivierungsstatus des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen wurden im Rahmen von Western Blot-Experimenten Schlüsselmoleküle beider Signalkaskaden in den B-ALL-Zelllinien RS4;11, SEM, REH und in den T-ALL-Zelllinien CEM, Jurkat und MOLT-4 hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht. Als Referenzzellen dienten B- und T-Lymphozyten, die aus peripherem Blut gesunder Personen isoliert wurden.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente zur Expression von PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-spezifischen Schlüsselproteine sind in Abbildung 3 dargestellt.

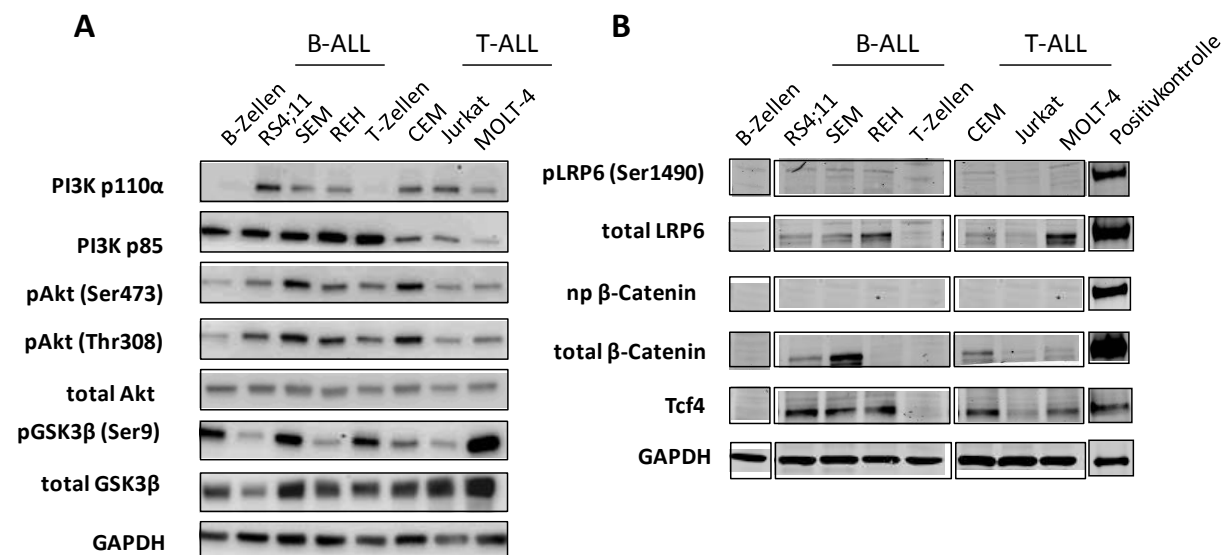


Abbildung 3. Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs (A) und des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (B) in ALL-Zelllinien. Dargestellt ist exemplarisch ein repräsentativer Western Blot aus 3 unabhängigen Experimenten. Das Protein GAPDH diente als Ladungskontrolle. B- und T-Zellen gesunder Probanden dienten als Referenzzellen.

Die Analysen zeigten, dass Schlüsselproteine beider Signalwege (PI3K, Akt, GSK3 β , LRP6, β -Catenin, Tcf4) in allen ALL-Zelllinien exprimiert werden, wobei die Expression und Phosphorylierungen sehr heterogen sind. Folglich ist die Aktivierung der Signalwege in den verschiedenen ALL-Zelllinien unterschiedlich stark. In den Kontrollzellen waren ebenfalls Signalweg-spezifische Proteine nachweisbar, deren Expression war im Vergleich zur Expression in den Tumorzellen aber oft weniger stark (z.B. PI3K p110 α , pAkt, total β -Catenin, Tcf4). Die PI3K/Akt-Aktivierung scheint in den Zelllinien SEM und CEM am stärksten, was über die zwei Phosphorylierungsstellen (pThr308, pSer473) der Kinase Akt nachweisbar ist. Diese zwei Zelllinien wiesen ebenfalls die stärkste Aktivierung des Wnt/

β -Catenin-Signalwegs auf, da sie die stärkste Expression des Effektor-Moleküls β -Catenin besaßen. Die aktive Form von β -Catenin (nicht-phosphoryliertes (np) β -Catenin) wurde in ALL-Zellen sowie den Referenzzellen B- und T-Zellen nicht nachgewiesen. Als Positivkontrolle für einen aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg dienten ReNcell VM Zellen im proliferierenden Status. Proliferierende ReNcell VM Zellen wiesen eine hohe Expression untersuchter Schlüsselmoleküle des Wnt-Signalwegs, einschließlich nicht phosphoryliertes β -Catenin, auf.

Neben Western Blot-Versuchen wurde die Expression des Wnt-Schlüsselmoleküls β -Catenin in ALL-Zelllinien mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Diese Methode ist stärker sensitiv und ermöglicht darüberhinaus Aussagen zur Lokalisation von β -Catenin, was einer genaueren Einschätzung des Wnt/ β -Catenin Aktivierungsstatus diene. In Abbildung 4 ist die endogene β -Catenin-Expression (grün) in den sechs zu untersuchenden ALL-Zelllinien dargestellt. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Als Positivkontrolle wurde die Kolonkarzinomzelllinie SW480 aufgrund der aberranten β -Catenin-Expression verwendet [147]. Als Referenzzellen dienten B- und T-Zellen gesunder Personen.

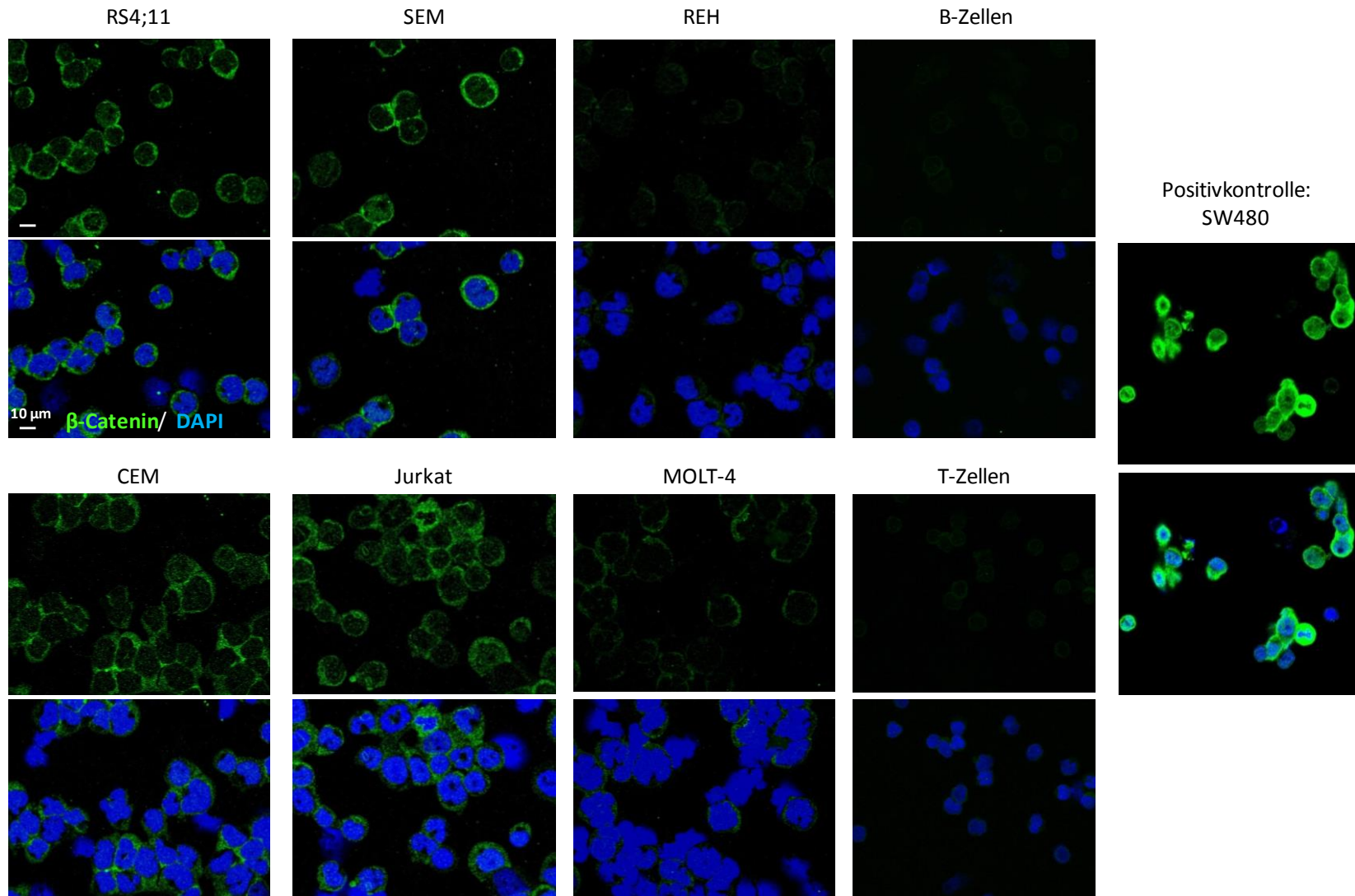


Abbildung 4: Endogene β -Catenin-Expression in ALL-Zelllinien.

Das Wnt-Effektorprotein β -Catenin wurde mittels Antikörpernachweis unter Verwendung eines Alexa-Fluor488-markierten sekundären Antikörpers (grün) dargestellt. Eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). B- und T-Zellen gesunder Probanden sowie die Kolonkarzinomzelllinie SW480 dienen als Kontrollzellen. Maßstab: 10 μ m.

In den Zelllinien RS4;11, SEM, CEM und Jurkat wurde die stärkste basale Expression von β -Catenin mittels Immunfluoreszenz detektiert. In MOLT-4 Zellen wurde β -Catenin etwas schwächer exprimiert und in REH-Zellen konnte endogen nur ein sehr schwaches β -Catenin-Signal nachgewiesen werden. Das nachgewiesene β -Catenin beschränkte sich in allen untersuchten ALL-Zelllinien fast ausschließlich auf das Zytoplasma, während im Zellkern nur sehr wenig β -Catenin detektierbar war. Im Vergleich dazu zeigte die als Positivkontrolle verwendete Zelllinie SW480 eine sehr viel stärkere β -Catenin-Expression, sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. In den als Referenzzellen verwendeten B- und T-Lymphozyten wurde fast gar kein β -Catenin detektiert.

3.1.2 Induktion einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Wnt3a-Stimulierung

Zur Steigerung der in den ALL-Zelllinien detektierten basal schwachen Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erfolgte eine Stimulierung der Zellen mit Wnt3a.

Die zwei Zelllinien mit endogen schwächster Wnt-Aktivierung, REH und MOLT-4, wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden Wnt3a (100, 250 und 500 ng/ml) behandelt, einzeln sowie in Kombinationsansätzen mit dem Inhibitor DKK-1 (100, 250 und 500 ng/ml). Nach der Behandlung erfolgte eine Analyse der Wnt-Schlüsselproteine pLRP6 (Ser1490), LRP6 und β -Catenin mittels Western Blot. GAPDH diente als Ladungskontrolle (Abbildung 5).

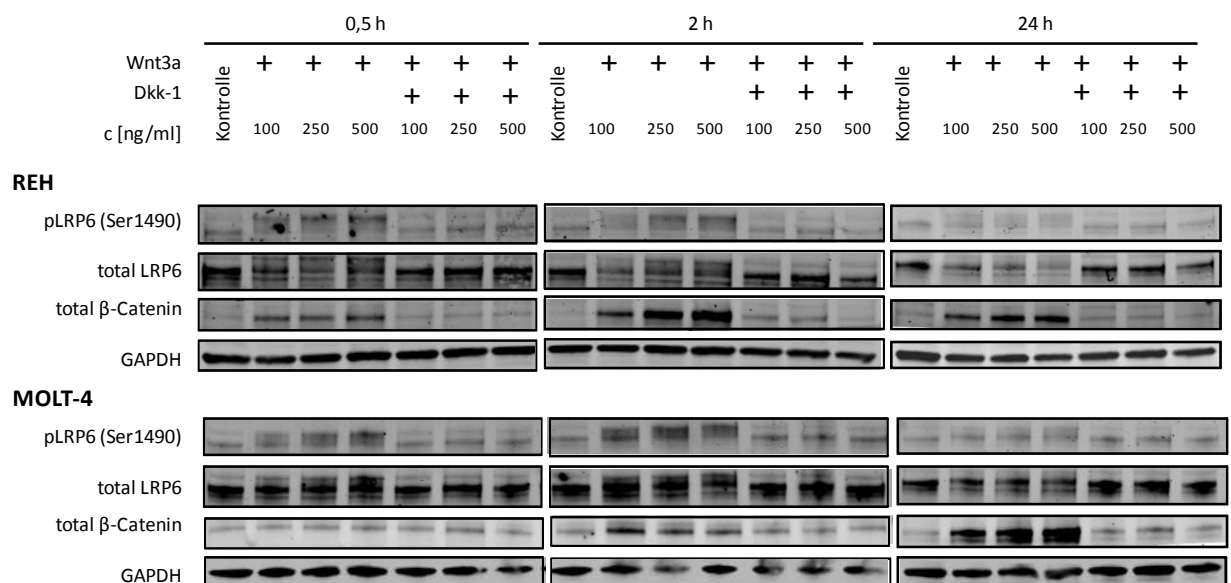


Abbildung 5. Wnt3a-Stimulation von ALL-Zelllinien mit endogen schwach-aktivem Wnt-Signalweg.

REH und MOLT-4-Zellen wurden zur Identifizierung geeigneter Wirkkonzentrationen einzeln mit Wnt3a sowie in Kombination mit Wnt3a und DKK-1 behandelt. Der Nachweis der ausgewählten Wnt-Schlüsselproteine pLRP6 (Ser1490), LRP6 und β -Catenin erfolgte mittels Western Blot. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Wnt3a-vermittelt konnte sowohl in REH als auch in MOLT-4 eine vermehrte Phosphorylierung des Rezeptors LRP6 an Position Ser1490 sowie ein Anstieg von β -Catenin detektiert werden. Die

höchsten β -Catenin-Spiegel wurden in REH-Zellen zum Analysezeitpunkt 2 h und in MOLT-4-Zellen 24 h nach Stimulierung detektiert. Für alle Folgeexperimente an den Zelllinien REH und MOLT-4 sowie an den anderen ALL-Zelllinien wurde unter Berücksichtigung der Metabolismus- und Zellteilungskinetiken ein intermediärer Analysezeitpunkt von 6 h sowie eine Wnt3a-Konzentration von 250 ng/ml festgelegt.

In Folgeexperimenten wurde die Wnt3a-Behandlung ($t=6$ h, $c=250$ ng/ml) auf alle sechs zu untersuchenden ALL-Zelllinien ausgeweitet und mittels sensitiver Immunfluoreszenz hinsichtlich der Wnt3a-induzierten relativen Änderung von β -Catenin untersucht. Die Zellen ließen sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf das aktivierende Wnt3a in drei Gruppen einteilen, welche am Beispiel jeweils einer Zelllinie aus jeder Gruppe in Abbildung 6 vorgestellt werden.

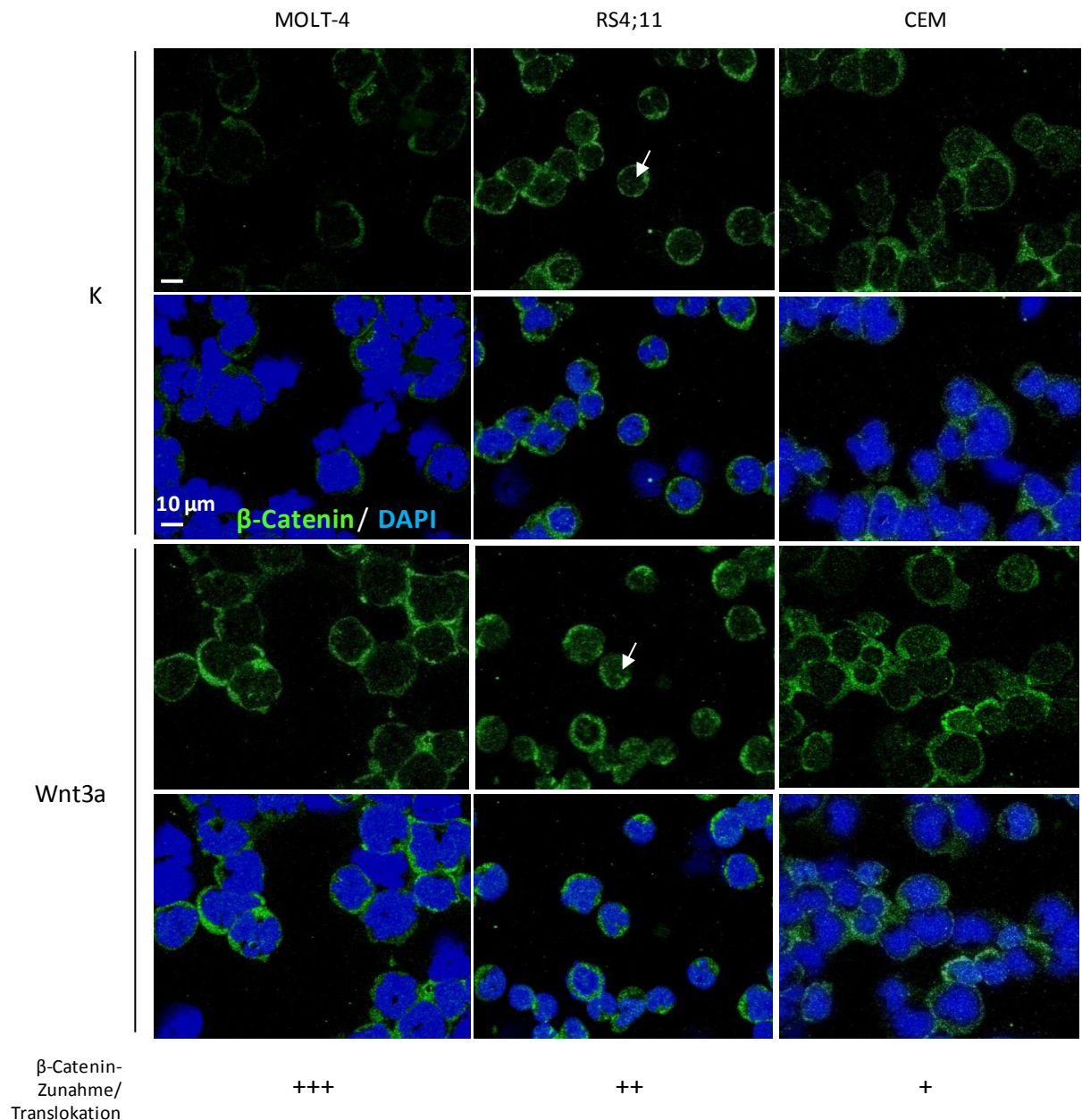


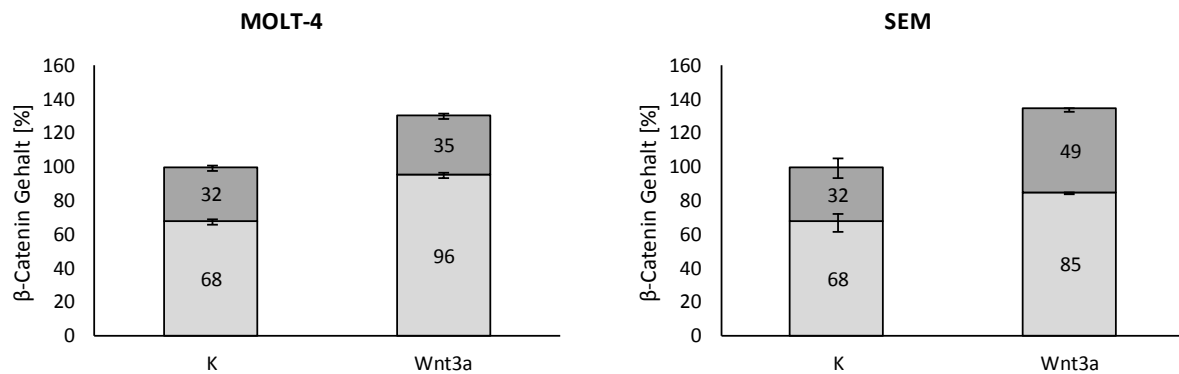
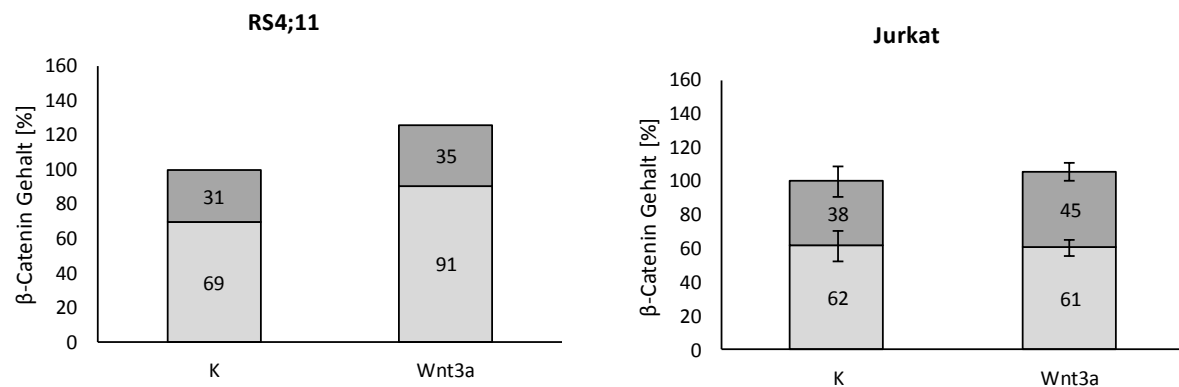
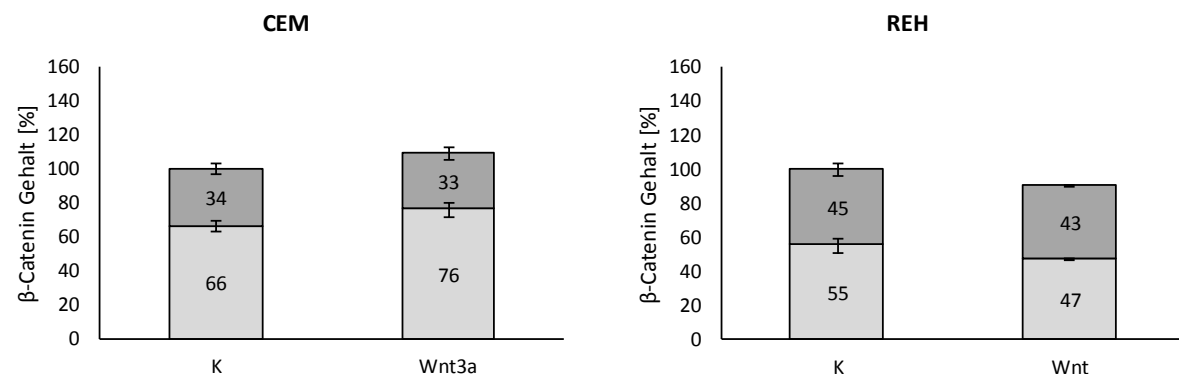
Abbildung 6. β -Catenin-Nachweis nach Wnt3a-Behandlung in ALL-Zelllinien.

β -Catenin (grün) wurde hinsichtlich seiner Expressionsstärke und Lokalisation in den ALL-Zelllinien RS4;11, SEM, REH, CEM, Jurkat und MOLT-4 untersucht. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Entsprechend der detektierten Änderung von β -Catenin wurden die behandelten Zelllinien gruppiert. Jeweils eine Zelllinie aus jeder Gruppe ist exemplarisch abgebildet. Maßstab 10 μ m.

Die Wnt3a-vermittelte Zunahme des Proteins β -Catenin war in der Zelllinie MOLT-4 am stärksten ausgeprägt und beschränkte sich auf das Zytoplasma. Auch die Zelllinie SEM reagierte mit relativ starker β -Catenin-Zunahme und gleichzeitiger Translokation von zytoplasmatischem β -Catenin in den Nukleus. MOLT-4 und SEM wurden daher zur Gruppe der Wnt3a-sensitiven Zellen zusammen gefasst (+++). Die Zelllinien Jurkat und RS4;11 reagierten auf die Wnt3a-Behandlung mit einer Zunahme des nukleären β -Catenins (Pfeil). Die relative Änderung der Gesamt-Expression von

β -Catenin war insgesamt weniger stark ausgeprägt als bei MOLT-4 und SEM, weshalb die zwei genannten Zelllinien zur Gruppe der intermediär Wnt3a-sensitiven Zellen zusammengefasst wurden (++). CEM und REH ließen sich durch eine Wnt3a-Behandlung nicht, bzw. nur in sehr geringem Maße, stimulieren und bildeten die Gruppe der nicht bis schwach Wnt3a-sensitiven Zelllinien (+(-)). Abbildung 6 zeigt jeweils eine repräsentative Zelllinie aus jeder der drei Gruppen. Die nicht gezeigten mikroskopischen Aufnahmen der Zelllinien SEM, Jurkat und REH sind im Anhang zusammengestellt (Abbildung 19).

Die Quantifizierung der mikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 7 dargestellt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten der Flächenelemente Zytoplasma und Zellkern wurden mittels ROI-Berechnung ermittelt.

Starke β -Catenin Zunahme/Translokation (+++)*Intermediäre β -Catenin Zunahme/Translokation (++)**Schwache β -Catenin Zunahme/Translokation (+/-)*

□ Zytoplasma ■ Zellkern

Abbildung 7: Intrazelluläre β -Catenin-Verteilung in ALL-Zelllinien nach Wnt3a-Behandlung.

Der intrazelluläre β -Catenin-Anteil wurde nach 6 h Wnt3a-Stimulation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dargestellt ist der mittlere prozentuale β -Catenin-Gehalt im Zellkern und Zytoplasma nach Wnt3a-Stimulierung im Vergleich zu Kontrollzellen aus n unabhängigen Experimenten (Zytoplasma- und Zellkernfraktion in Kontrollansätzen = 100 %). MOLT-4: n= 3, SEM: n= 3, RS4;11: n= 1, Jurkat: n= 2, CEM: n= 3, REH: n= 3.

Neben der Immunfluoreszenz wurde die β -Catenin-Expression über eine Trennung von Zytoplasma- bzw. Zellkernfraktion und einen im Anschluss durchgeführten Western Blot analysiert. Als

Zytoplasma-Marker wurde GAPDH verwendet, als charakteristisches Nachweisprotein für Kernfraktionen diente das Histon H3. Die Analysen wurden zunächst an den Zelllinien RS4;11, SEM, Jurkat und CEM für zwei Zeitpunkte (6 h und 24 h) durchgeführt. In REH und MOLT-4-Zellen wurden die Analysen anschließend für einen Zeitpunkt (6 h) analog realisiert. Die Ergebnisse der Fraktionierungen sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

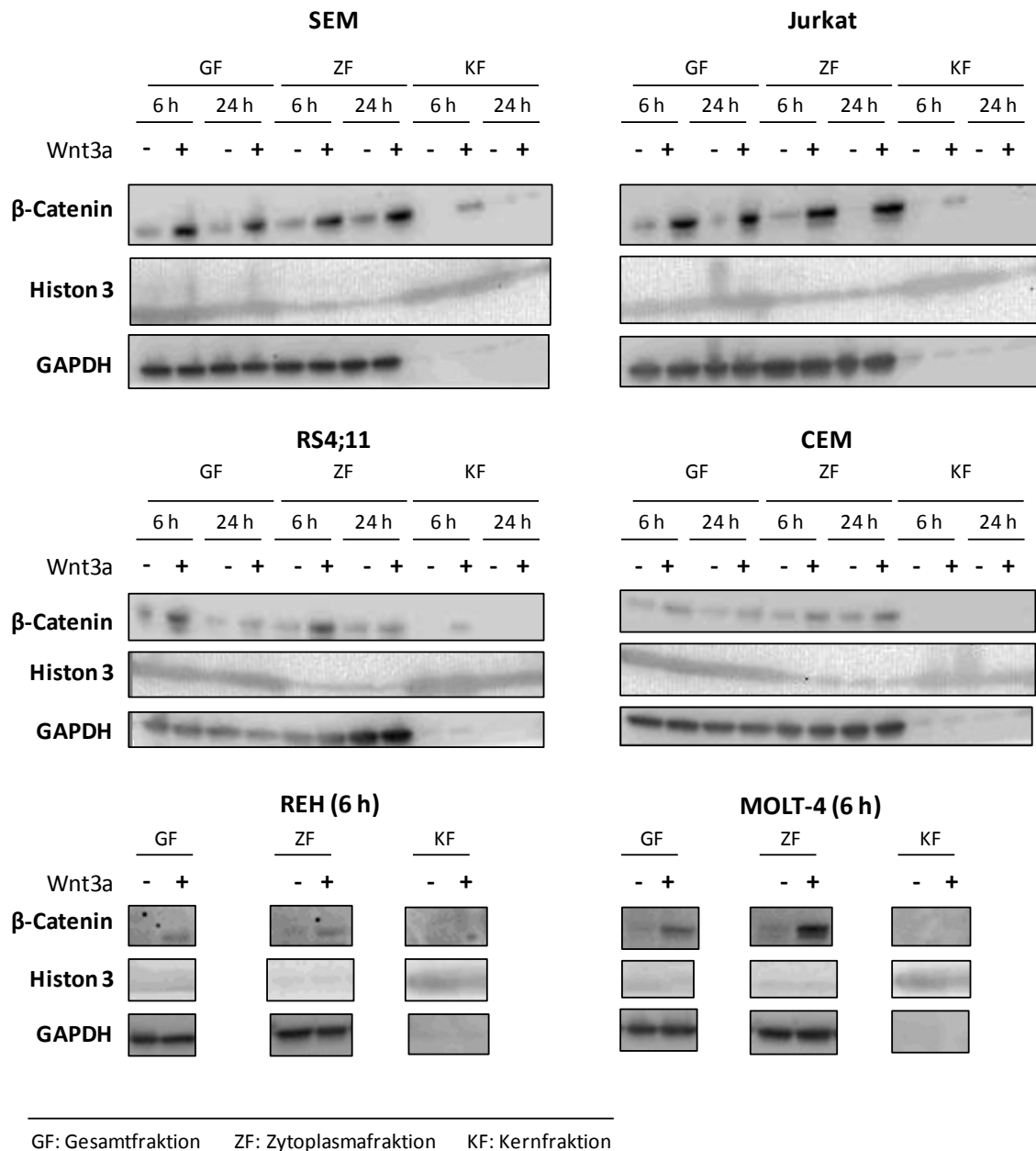


Abbildung 8. Zytoplasmatisches und nukleäres β-Catenin nach Wnt3a-Behandlung (Western Blot).

Proteinfraktionierung und anschließende Western-Blot-Experimente wurden zur Lokalisierung von β-Catenin in den ALL-Zelllinien RS4;11, SEM, REH, CEM, Jurkat und MOLT-4 nach Stimulierung mittels Wnt3a durchgeführt. GAPDH diente als Zytoplasmamarker. Das Protein Histon H3 wurde als Kernmarker verwendet.

In den Zelllinien SEM, Jurkat und RS4;11 wurde Wnt3a-vermittelt nach 6 h und 24 h ein Anstieg der β-Catenin-Spiegel, sowohl in der Zytoplasma- als auch in der Kernfraktion, detektiert. Die höchste

nukleäre β -Catenin-Expression wurde dabei im frühen Analysezeitpunkt von 6 h nachgewiesen. In REH- und CEM-Zellen konnte durch Wnt3a-Behandlung nur ein sehr geringer Anstieg der β -Catenin-Expression induziert werden, der sich lediglich auf das Zytoplasma beschränkte. Die Zelllinie MOLT-4 reagierte mit einem verhältnismäßig starken Anstieg von β -Catenin, der zum Zeitpunkt von 6 h lediglich in der Zytoplasmafraktion nachweisbar war.

In Tabelle 16 werden die Ergebnisse der Wnt3a-vermittelten Induktion des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zelllinien zusammengefasst. Sie dient der Darstellung von Anzahl und Reproduzierbarkeit aller durchgeführten unabhängigen Experimente mittels zwei unabhängiger Methoden, Immunfluoreszenz und Proteinfractionierung. Je Zelllinie wurden insgesamt mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse zur β -Catenin-Translokation (Immunfluoreszenz vs. Proteinfractionierung).

<i>Wnt3a-abh. β-Catenin-Zunahme/Translokation:</i>		<i>Stark +++</i>	<i>Intermediär ++</i>	<i>Sehr schwach +/-</i>	<i>Biol. Replikate</i>
MOLT-4	IF	Z			n=3
	Frakt./WB	Z			n=3
SEM	IF	Z/N			n=3
	Frakt./WB	Z/N			n=3
RS4;11	IF		Z*/N		n=1
	Frakt./WB		Z*/N		n=2
Jurkat	IF		N		n=2
	Frakt./WB		Z/N		n=3
CEM	IF			(Z*)	n=3
	Frakt./WB			(Z*)	n=2
REH	IF			weder Z noch N	n=3
	Frakt./WB			(Z*)	n=2

IF: Immunfluoreszenz; Frakt./WB: Proteinfractionierung und Western Blot; Z: Zytoplasma; N: Nukleus; *: sehr schwache relative Änderung

3.1.3 Einfluss von Wnt3a auf die metabolische Aktivität von ALL-Zellen

Um die Bedeutung einer induzierten Wnt-Aktivierung für das Proliferationsverhalten von ALL-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Wnt3a behandelt und nach 72 h hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität mit Hilfe des WST-1 Tests untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 9 dargestellt.

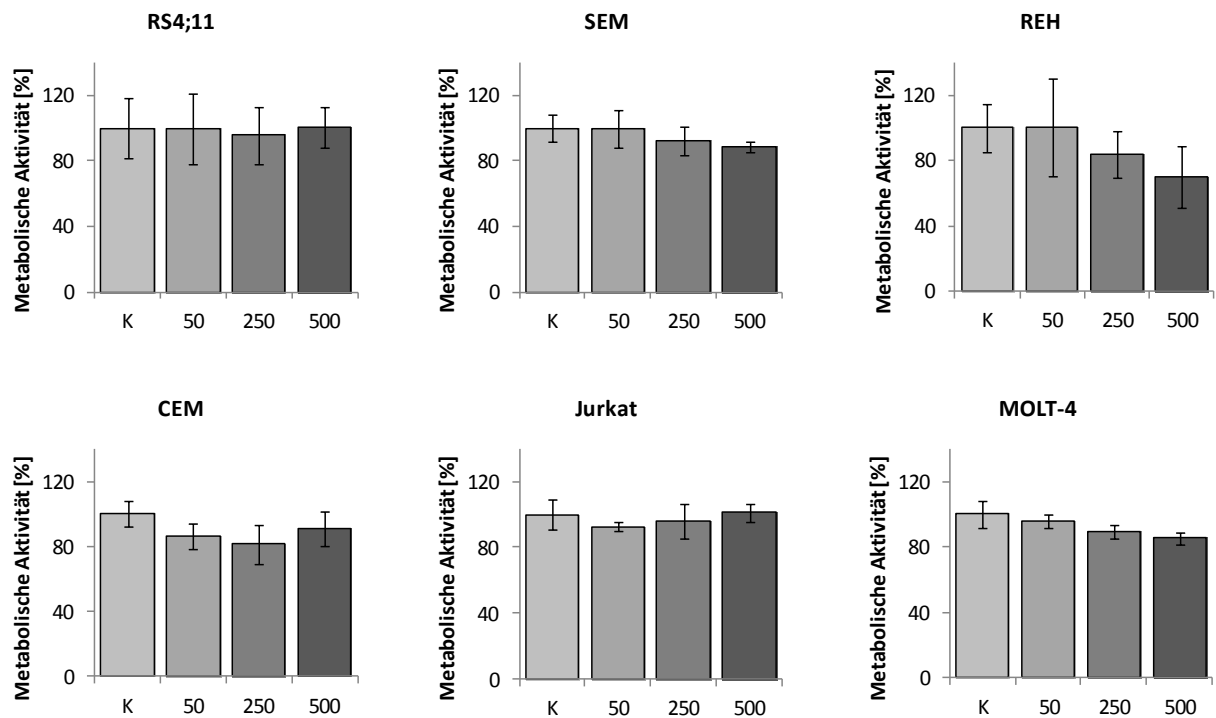


Abbildung 9. Metabolische Aktivität von ALL-Zellen nach Wnt3a-Behandlung.

Die sechs untersuchten ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Wnt3a (50 – 500 ng/ml) kultiviert und im Anschluss mittels WST-1 Test hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

In REH Zellen wurde eine geringe Wnt3a-vermittelte Inhibition der Zellproliferation bei hohen verabreichten Konzentrationen des Liganden Wnt3a beobachtet, wobei die Hemmung nicht signifikant war ($p = 0,087$). In keiner der anderen untersuchten Zelllinien konnte eine differentielle Änderung der metabolischen Aktivität nach einer Behandlung mit Wnt3a nachgewiesen werden.

3.1.4 Expression bekannter universeller Wnt-Zielgenen nach Wnt3a-Stimulierung

Ein aktiver Wnt-Signalweg führt zur Akkumulation von β -Catenin, welches in den Zellkern transloziert und dort als Cotranskriptionsfaktor von Tcf/Lef die Expression von Zielgenen aktiviert. Zur vollständigen Analyse eines funktionellen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erfolgte daher der Expressionsnachweis universeller Wnt-Zielgene.

Als Zielgene wurden *CCND1*, *MYC* und *LEF1* ausgewählt und mittels quantitativer real-time PCR nachgewiesen wurden.

Anhand der Immunfluoreszenz-Experimente nach erfolgter Wnt3a-Behandlung wurden die Zelllinien ausgewählt, die am stärksten mit einer vermehrten nukleären β -Catenin-Expression reagierten (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dies traf in besonderem Maße auf die Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat zu, welche aus diesem Grund für Expressionsstudien der genannten Wnt-Zielgene verwendet wurden. Zur Darstellung einer Reaktionskinetik wurden drei unterschiedliche Analysezeitpunkte ausgewählt: 6 h,

24 h und 48 h. Die Ergebnisse der Zielgenexpression in SEM, RS4;11 und Jurkat Zellen sind in Abbildung 10 dargestellt.

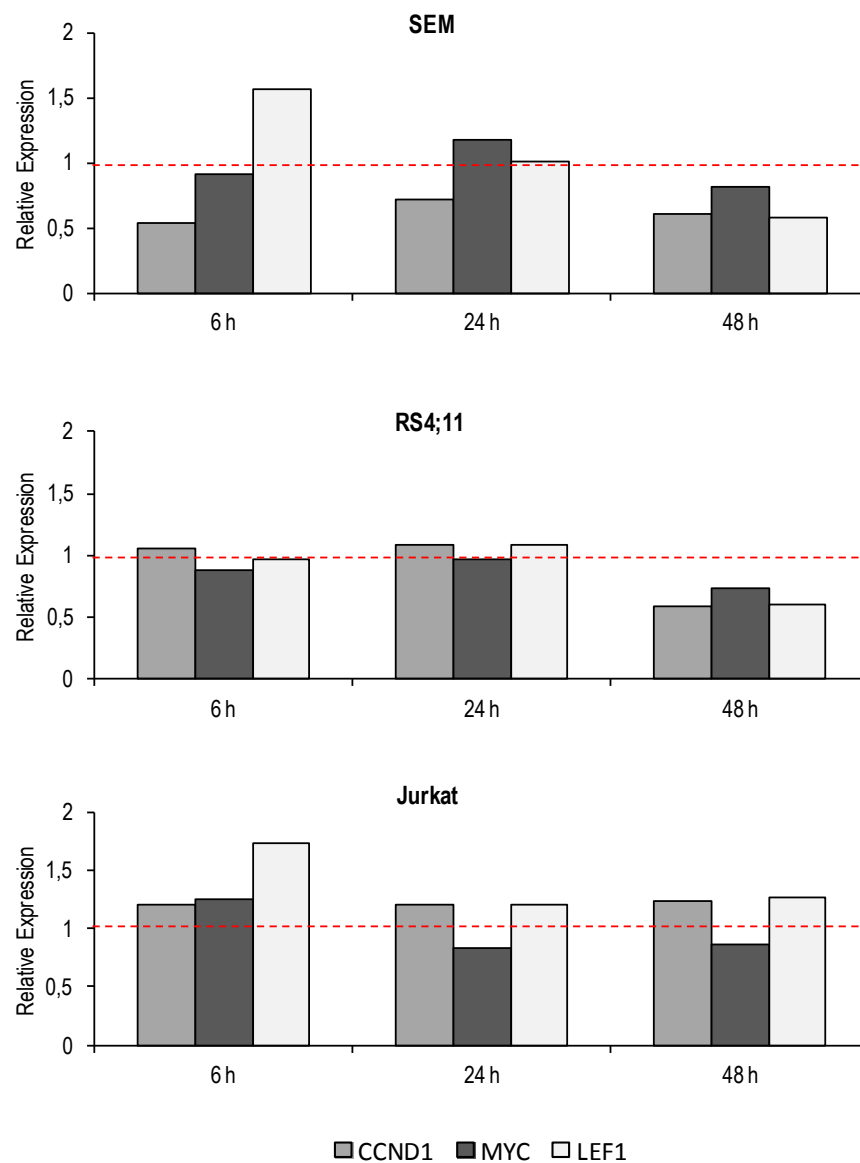


Abbildung 10. Expression von Wnt-Zielgenen nach Wnt3a-Behandlung in ALL-Zelllinien.

Wnt3a-induziert wurden die Wnt-Zielgene *CCND1*, *MYC* und *LEF1* in den untersuchten ALL-Zelllinien nicht bis schwach differentiell exprimiert. Zur Normierung wurde *GAPDH* verwendet. Die Expression in Kontrollzellen beträgt 1 (rote Linie). Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten n unabhängiger Experimente: SEM: n= 2; RS4;11: n= 1; Jurkat: n= 1.

Die Wnt3a-vermittelte relative Expression der drei untersuchten Wnt-Zielgene variierte in den unterschiedlichen ALL-Zelllinien, wobei die Änderungen nicht signifikant waren. Während in RS4;11-Zellen keine Wnt3a-vermittelten Effekte beobachtet werden konnten, kam es in den Zelllinien SEM und Jurkat zu einer schwachen Zunahme der *LEF1*-Expression zum Zeitpunkt 6 h. Diese betrug 1,5 bzw. 1,7 verglichen mit Kontrollansätzen. Das Gen *CCND1* wurde in Wnt3a-behandelten SEM-Zellen nur etwa halb so stark exprimiert wie in unbehandelten Zellen.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen

3.2.1 Einfluss von PI3K/Akt-Modulatoren auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Eine Interaktion der PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege ist über das gemeinsame Schlüsselprotein GSK3 β denkbar. Mit Hilfe spezifischer aktivierenden und inhibierenden Substanzen wurden Interaktionsstudien an ausgewählten Zelllinien durchgeführt. Dazu wurde je eine Zelllinie der vorgestellten unterschiedlich Wnt3a-sensitiven Gruppen mit spezifischen Inhibitoren bzw. Aktivatoren behandelt. Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs wurde durch Verwendung des FLT3 Liganden (FLT3L) induziert. Eine PI3K-Inhibition erfolgte mittels LY294002. Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand der Zelllinie SEM vorgestellt.

Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels FLT3L

Die Induktion einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgte mittels FLT3L ($c = 50$ ng/ml), in deren Anwesenheit die Zellen für 48 h kultiviert wurden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t = 0,5$ h/6 h; 24 h, 48 h) erfolgte ein Nachweis der PI3K/Akt- Schlüsselproteine (Akt, GSK3 β) mittels Western Blot sowie von β -Catenin mittels Immunfluoreszenz. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind Abbildung 11 am Beispiel der Zelllinie SEM dargestellt.

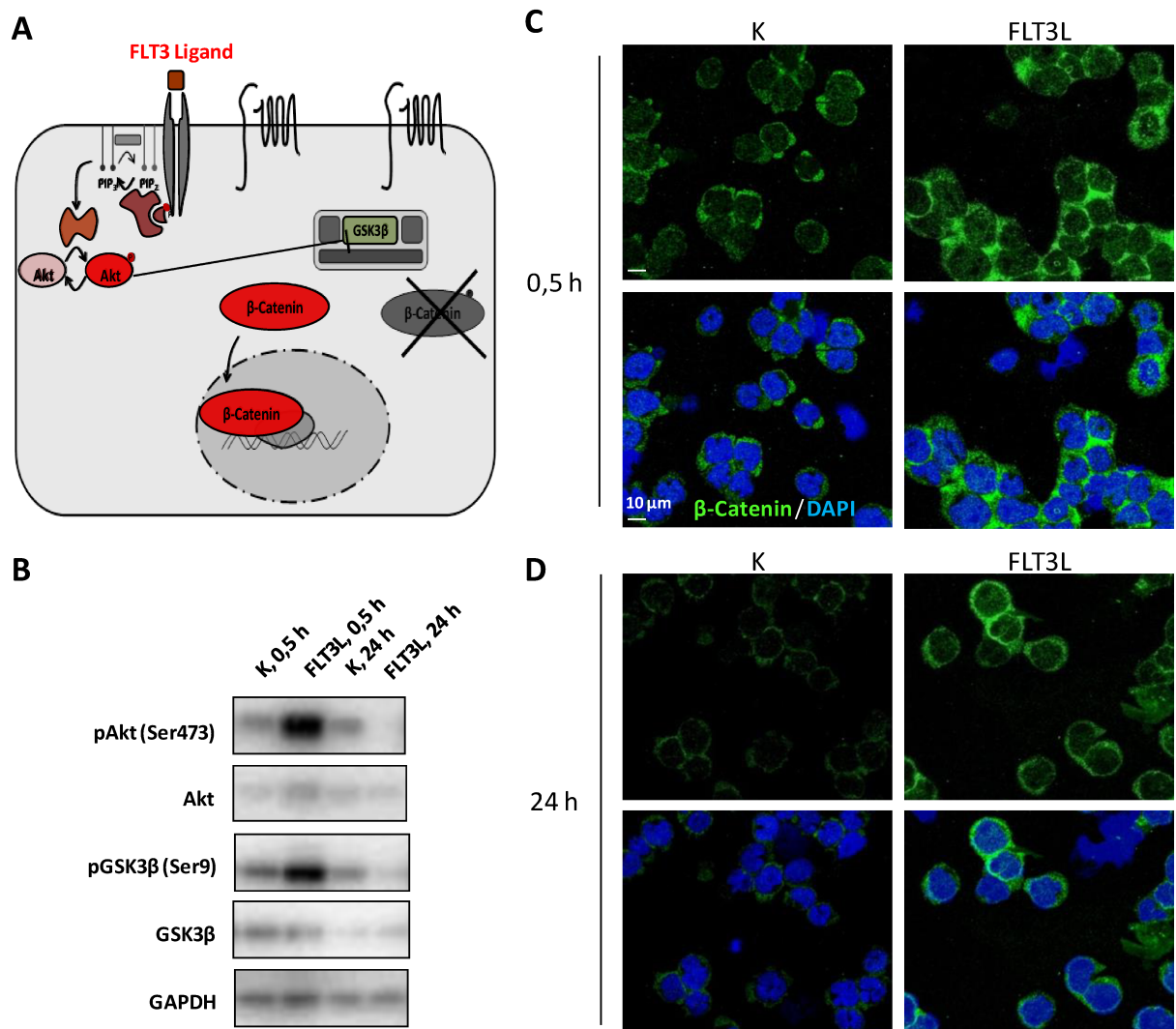


Abbildung 11. Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/β-Catenin-Signalwegs mittels FLT3 Ligand in SEM-Zellen. Skizzierung der erwarteten durch FLT3L vermittelten Effekte (A). Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels FLT3L wurde über einen Anstieg von pAkt und pGSK3β im Western Blot nachgewiesen (B). Eine Akkumulation von β-Catenin wurde nach 0,5 h und 24 h mittels Immunfluoreszenz detektiert (C und D).

Eine FLT3L-Behandlung führte nach 0,5 h zu einer Zunahme von pAkt (Ser473) und pGSK3β (S9). Auch das Protein β-Catenin konnte in frühen sowie späten Analysezeitpunkten FLT3L-vermittelt verstärkt mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Die für SEM dargestellten Ergebnisse konnten ebenfalls für die Zelllinien MOLT-4 generiert werden. Auch in RS4;11-Zellen wurde nach FLT3L-Behandlung ein Anstieg von pAkt (Ser473), pGSK3β (S9) und von β-Catenin detektiert. Die Ergebnisse der Western Blot- und Immunfluoreszenz-Versuche von MOLT-4 und RS4;11 sind im Anhang gezeigt (Abbildung 20).

In CEM-Zellen konnte keine Änderung der β-Catenin-Expression oder -Lokalisation durch Stimulation des PI3K/Akt-Signalwegs detektiert werden. (Daten im Anhang gezeigt, Abbildung 20).

Inhibierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels LY294002

Mittels PI3K-Inhibitor LY294002 ($c = 50 \mu\text{M}$) wurde eine Hemmung des Signalwegs in SEM Zellen induziert. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 12 dargestellt.

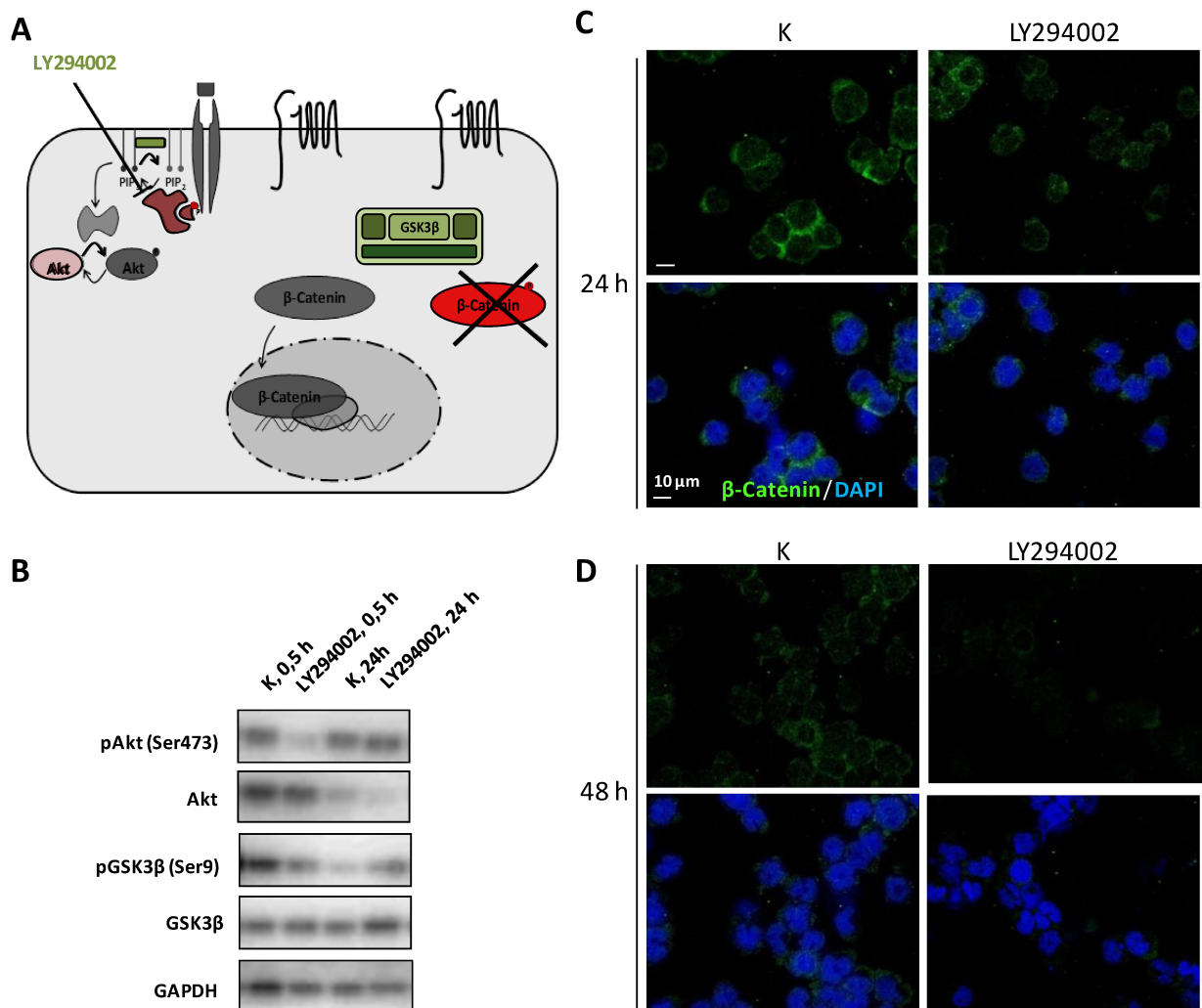


Abbildung 12. Interaktion des PI3K/Akt- und Wnt/β-Catenin-Signalwegs mittels LY294002 in SEM-Zellen.

Skizzierung der erwarteten durch LY294002 vermittelten Effekte (A). Eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs durch LY294002-Behandlung konnte mittels Western Blot bestätigt werden (B). Mittels Immunfluoreszenz wurde eine Abnahme von β-Catenin 24 h und 48 h nach LY294002-Behandlung nachgewiesen (C und D).

Die behandelten Zellen zeigten nach 0,5 h eine Abnahme von pAkt (Ser473), welche zu späten Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar war. LY294002-vermittelt wurde zum Zeitpunkt 24 h eine Zunahme der Phosphorylierung von GSK3β an Position Serin 9 detektiert. Die Gesamtform von GSK3β wurde durch die LY294002-Behandlung nicht differentiell exprimiert. Eine Abnahme der β-Catenin-Expression wurde über Immunfluoreszenzen in späten Zeitpunkten (24 h, 48 h) detektiert.

Eine Hemmung von PI3K mittels LY294002 führte in CEM und MOLT-4 Zellen ebenso wie für SEM gezeigt zu einer Abnahme der β -Catenin-Expression, wie sie für eine Inhibition des Wnt-Signalwegs charakteristisch ist (Daten im Anhang gezeigt, Abbildung 21).

3.2.2 Einfluss von Wnt/ β -Catenin-Modulatoren auf den PI3K/Akt-Signalweg

Neben einer Modulation des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgte eine Stimulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Wnt3a in allen sechs ALL-Zelllinien. In diesem Kontext analysierte differentielle Änderungen von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalwegs dienten der Untersuchung von gegenseitiger Regulation. Abbildung 13 zeigt einen repräsentativen Western Blot dieses Versuchs.

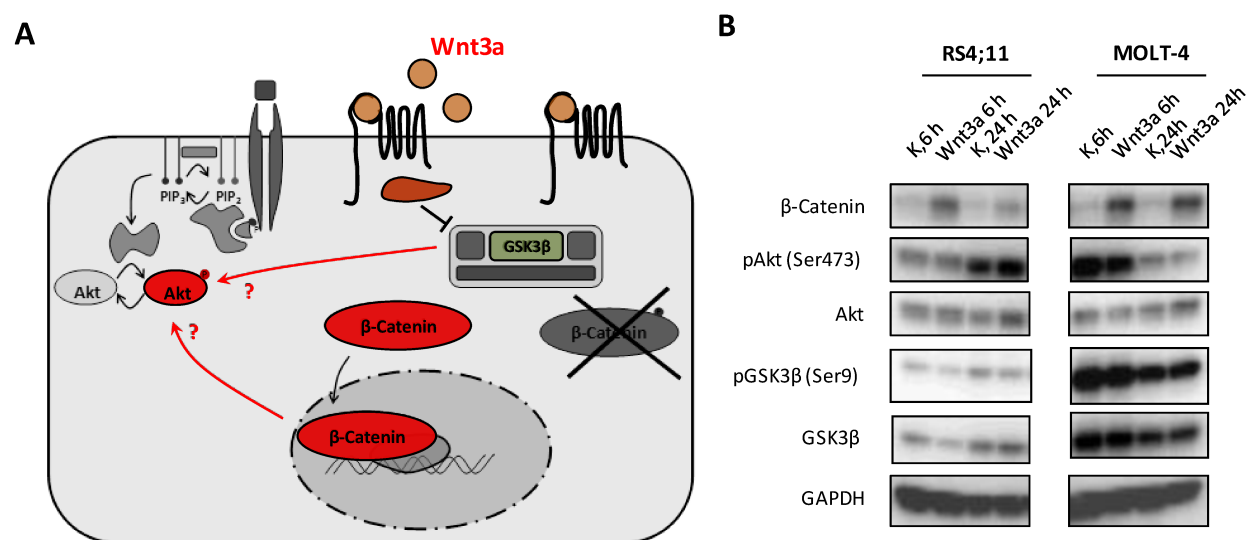


Abbildung 13. Der Einfluss von Wnt3a auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalwegs.

Skizzierung möglicher Interaktionsachsen des PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (A). In MOLT-4 Zellen wurde eine geringe Abnahme von pAkt (Ser473) durch Wnt3a-Behandlung ($t=6$ h) induziert (B). In RS4;11 Zellen kam es nach 24 h zu einer geringen Wnt3a-vermittelten Zunahme von pAkt (Ser473) (B).

In den Zelllinien RS4;11 und MOLT-4 konnte Wnt3a-vermittelt eine differentielle Änderung der Expression des zentralen Proteins Akt detektiert werden. MOLT-4 Zellen reagierten auf Wnt3a-Behandlung mit einer schwachen Abnahme von pAkt (Ser473). Konträr dazu wurde in der Zelllinie RS4;11 eine Zunahme von pAkt (Ser473) detektiert. Eine differentielle Expression des dem PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalweg gemeinsamen Proteins GSK3 β konnte weder in RS4;11 noch in MOLT-4 nachgewiesen werden. In den Zelllinien SEM, REH, CEM und Jurkat wurde keine differentielle Änderung von PI3K/Akt-Schlüsselproteinen durch Wnt3a-Behandlung nachgewiesen (Ergebnisse im Anhang gezeigt, Abbildung 22).

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde im Rahmen verschiedener funktioneller Studien und mittels vielfältigen Methoden hinsichtlich seines endogenen Aktivierungsstatus untersucht. Weiterhin wurde mittels Wnt3a-Behandlung eine Induktion der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion induziert und diese mittels Untersuchungsmethoden wie dem WST-1 Test und der Expressionsanalyse universeller Wnt-Zielgene mittels qPCR bewertet. In keiner der untersuchten ALL-Zelllinien konnte eine alle Ebenen-umfassende Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs detektiert werden. Die Zelllinien REH und CEM zeigten in keiner der Stimulations-Versuche differentielle Effekte im Vergleich zu Kontrollansätzen. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen zum Wnt-Signalweg in ALL-Zelllinien sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse zur endogenen und induzierten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs einschließlich Zielgenexpression.

	endogene Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs			induzierte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Wnt3a			
	np- β -Catenin	β -Catenin Zytoplasma	β -Catenin Zellkern	β -Catenin nach Wnt3a	Via PI3K/Akt-Aktivierung	Metabolische Aktivität	Zielgen-Expression
MOLT-4	-	+	-	+	+	-	-
SEM	-	+	-	+	+	-	-
RS4;11	-	+	-	+	+	-	-
Jurkat	-	+	-	+	nb	-	-
CEM	-	+	-	-	-	-	nb
REH	-	-	-	-	nb	-	-

nb: nicht bestimmt

+ Zunahme

- keine Expression/differentielle Änderung

Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit vorläufig zusammenfassend, kann herausgearbeitet werden, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in ALL-Zelllinien in unterschiedlichem Maße aktiviert werden kann. Experimente zur Wnt3a-vermittelten differentiellen Änderung der metabolischen Aktivität bzw. der Zielgenexpression erlauben Einblicke in die endständigen Vorgänge der Wnt-Signaltransduktion. Diese Analysen deckten auf, dass alle untersuchten ALL-Zelllinien einen proximal atypischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufweisen.

3.3 Die Expression der miR-126, -210 und -214 in ALL-Zellen

MiRs induzieren eine Degradierung komplementärer mRNA-Sequenzen bzw. blockieren die Initiation der Proteinbiosynthese. Bedingt durch chromosomale Aberrationen oder andere genetische Veränderungen kommt es häufig zur Veränderung der miR-Expression und dadurch zur Modulation

ihrer regulierenden Eigenschaften zugunsten einer gesteigerten bzw. verminderten Hemmung ihrer Ziel-mRNAs. Leukämiezellen weisen oft eine Vielzahl genetischer Anomalien auf, sodass wahrscheinlich auch die Expression vieler miRs verändert ist.

Basierend auf einer umfassenden Literaturrecherche wurden folgende miRs ausgewählt, um ihre Expressionsprofile im Kontext der PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion zu analysieren: die miR-126, -210 und -214.

Die Studien zur Expression der genannten miRs wurden in ALL-Zelllinien sowie in Zellen aus 16 an ALL erkrankten Personen mittels quantitativer *real-time* PCR ermittelt. Als entsprechende Kontrollzellen dienten B- und T-Zellen, die aus peripherem Blut gesunder Probanden isoliert wurden. Die Ergebnisse der Expression der miR-126, miR-210 und miR-214 in ALL-Zelllinien und -Primärzellen werden in Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 zusammengefasst.

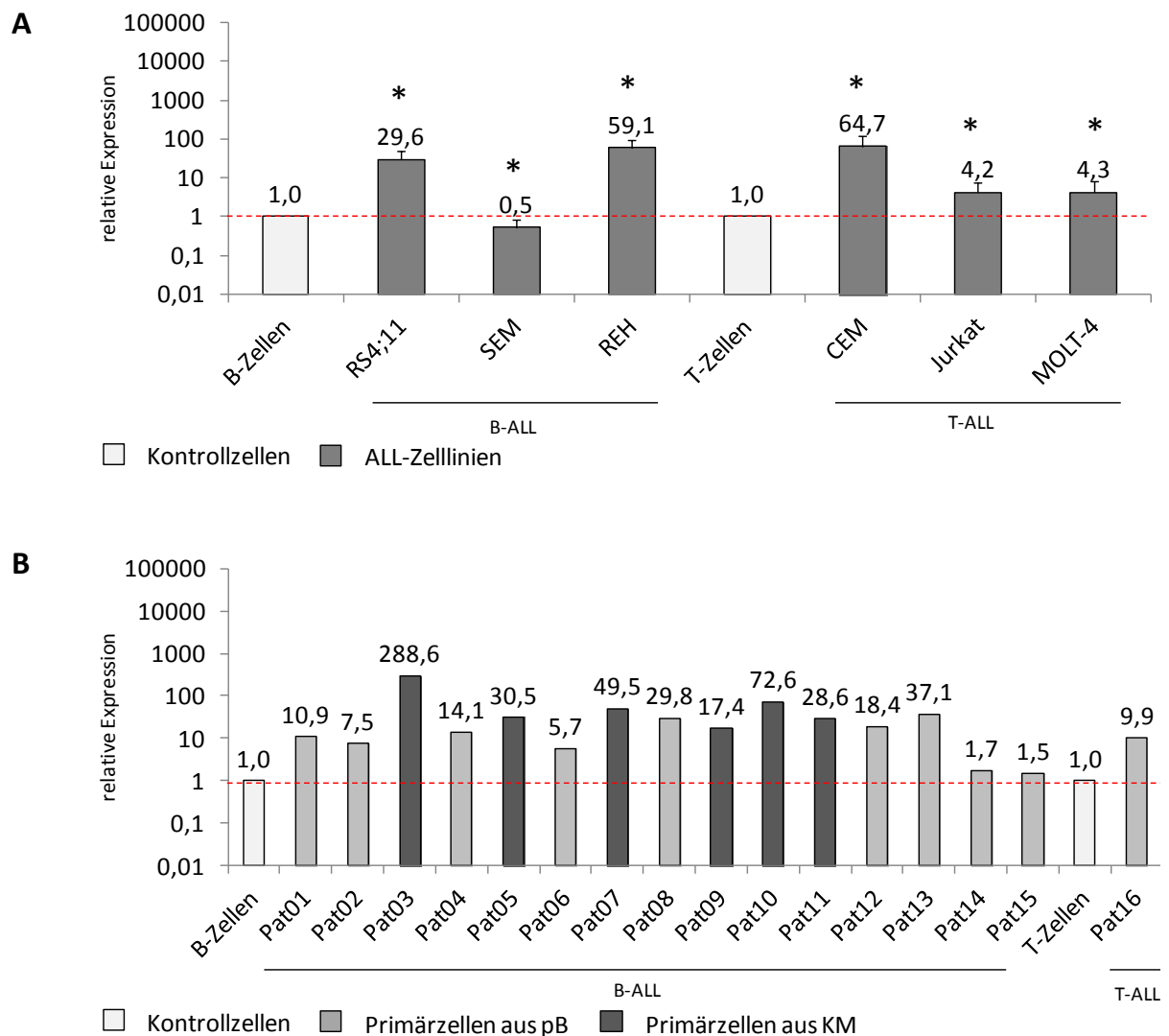


Abbildung 14: Die Expression der miR-126 in ALL-Zelllinien (A) und *de novo* ALL-Zellen (B).

Zur Normierung diente GAPDH. Als Referenz wurden B- und T-Zellen gesunder Personen verwendet (rote Linie). Technische Replikate: 3. Biologische Replikate: B-Zellen (gepoolt), T-Zellen (gepoolt), RS4;11, SEM, REH, Jurkat, CEM, MOLT-4: n= 3; Pat01-Pat16: n= 1. Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

In den untersuchten ALL-Zelllinien konnten folgende miR-Expressionsprofile ermittelt werden:

Die miR-126 wurde in nahezu allen untersuchten Zellen (Ausnahme SEM) stärker als in B- bzw. T-Zellen exprimiert. Dabei war die Zunahme der Expression sehr heterogen und schwankte zwischen Faktor 4 und 65. In *de novo*-Zellen betrug die Zunahme der Expression zwischen Faktor 1,5 (Pat15) und 288 (Pat03) im Vergleich zu B- oder T-Lymphozyten gesunder Personen. Damit lag die miR-126-Expression in Primärzellen (39,0) im Mittel noch über der relativen Expression in den untersuchten ALL-Zelllinien (27,1).

Die Expression der miR-210 in ALL-Zelllinien und -*de novo*-Zellen ist in Abbildung 15 dargestellt.

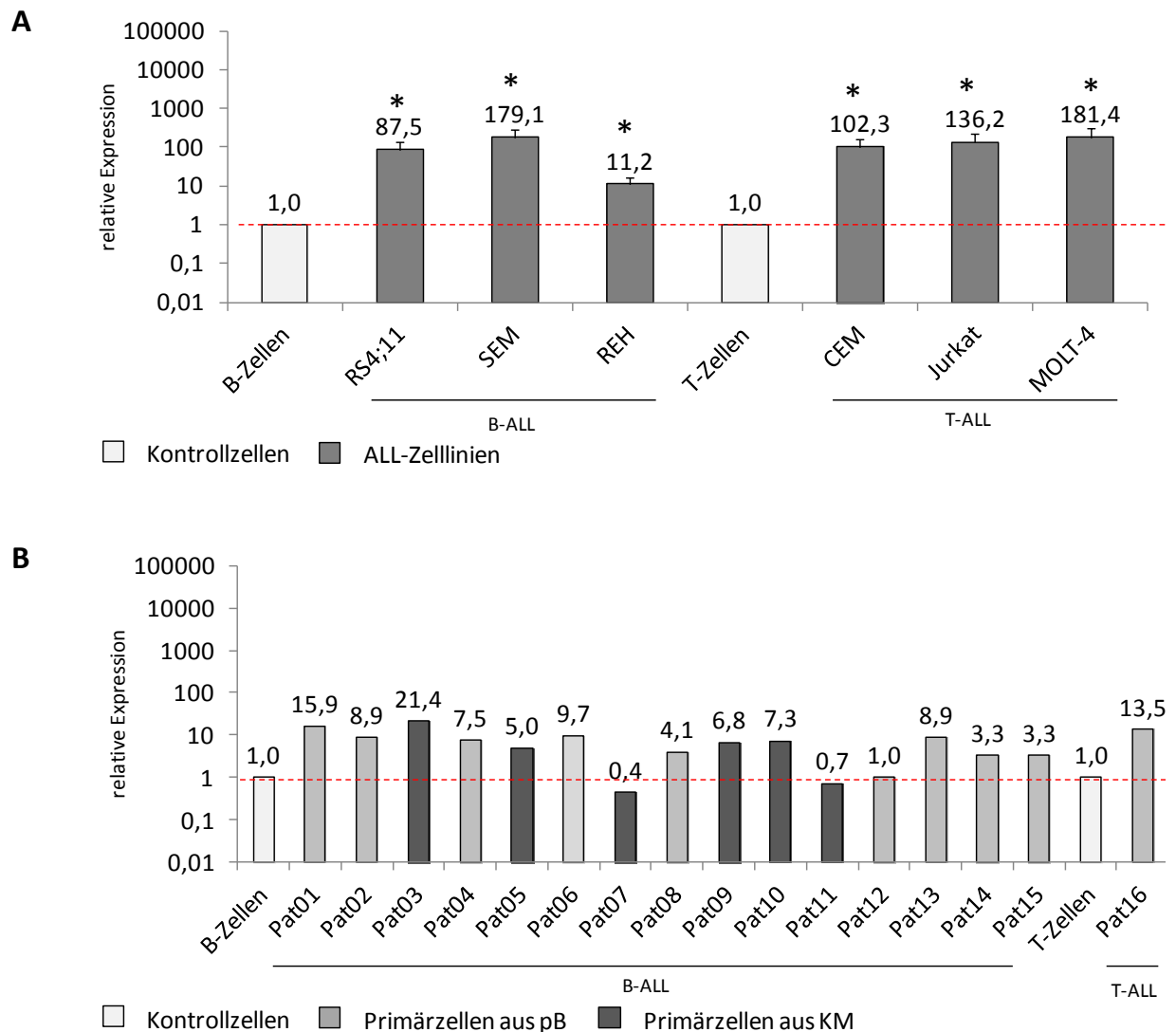


Abbildung 15: Die Expression der miR-210 in ALL-Zelllinien (A) und *de novo* ALL-Zellen (B).

Zur Normierung diente GAPDH. Als Referenz wurden B- und T-Zellen gesunder Personen verwendet (rote Linie). Technische Replikate: 3. Biologische Replikate: B-Zellen (gepoolt), T-Zellen (gepoolt), RS4;11, SEM, REH, Jurkat, CEM, MOLT-4: n= 3; Pat01-Pat16: n= 1. Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die relative miR-210 Expression in den B-ALL-Zelllinien war um den Faktor 11 bis 181 erhöht. In den T-ALL-Zelllinien betrug die Zunahme 100 bis 180 im Vergleich zu Kontrollzellen und lag damit über der Expression in den untersuchten B-ALL-Zelllinien. In Primärzellen wurde im Mittel eine geringere relative miR-210 Expression als in ALL-Zelllinien nachgewiesen. Die stärkste relative Expression in Primärzellen betrug Faktor 21 (Pat03) im Vergleich zu B- bzw. T-Zellen. Zwei von 16 analysierten Patientenproben besaßen eine mit 0,5 (Pat07) und 0,7 (Pat11) niedrigere relative miR-210 Expression als B-Zellen.

Abbildung 16 fasst die Ergebnisse zur miR-214-Expression in ALL-Zellen zusammen.

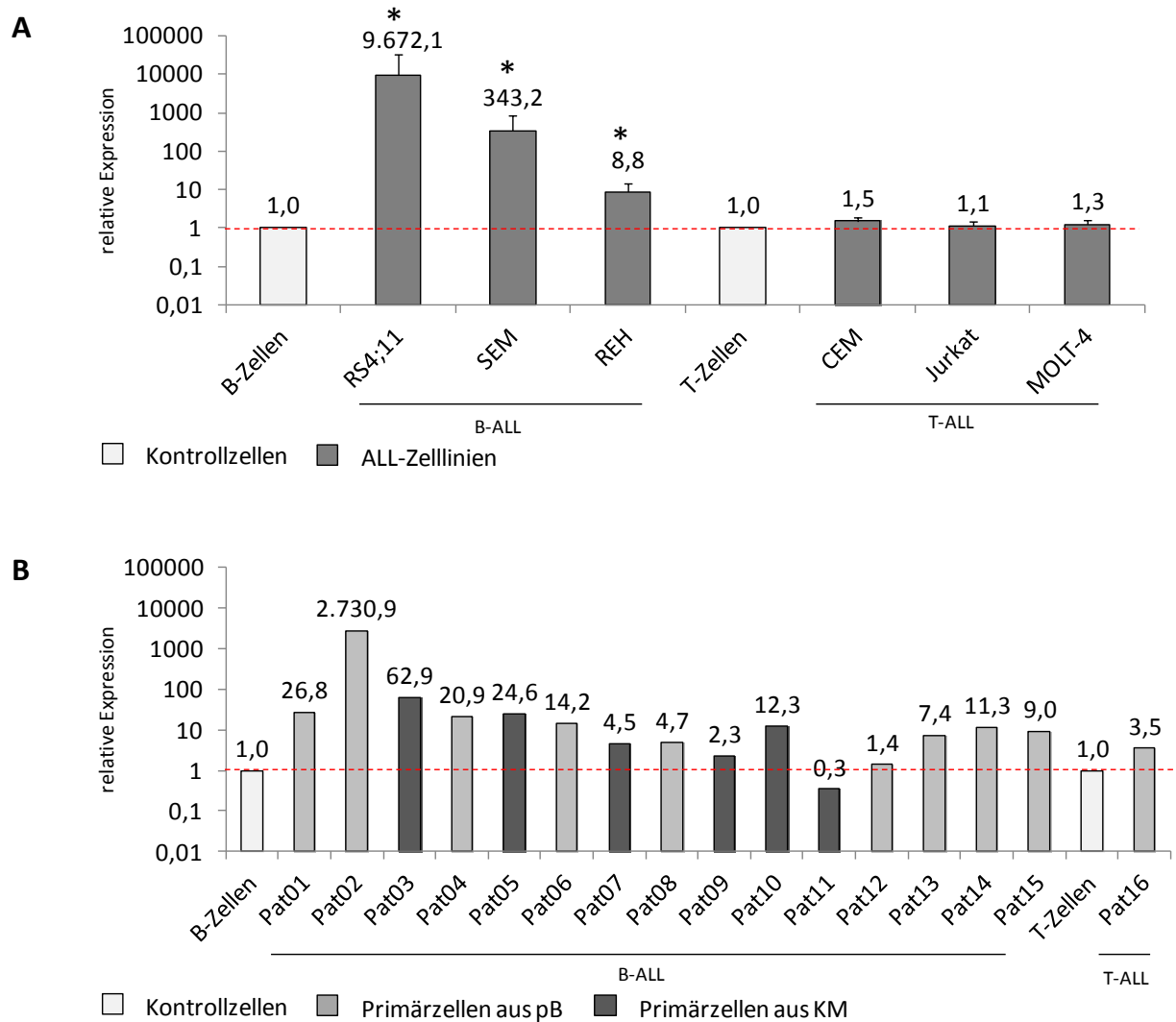


Abbildung 16. Die Expression der miR-214 in ALL-Zelllinien (A) und *de novo* ALL-Zellen (B).

Zur Normierung diente GAPDH. Als Referenz wurden B- und T-Zellen gesunder Personen verwendet (rote Linie). Technische Replikate: 3. Biologische Replikate: B-Zellen (gepoolt), T-Zellen (gepoolt), RS4;11, SEM, REH, Jurkat, CEM, MOLT-4: n = 3; Pat01-Pat16: n = 1. Signifikanzen ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die miR-214-Expression innerhalb der Gruppe der B-ALL-Zelllinien war sehr heterogen. Hier schwankte die Expressionsrate von Faktor 9 bis 10000 bezogen auf die Expression in B-Zellen. Die T-ALL Zelllinien zeigten weniger starke Unterschiede im Vergleich zu T-Lymphozyten. Die relative miR-214 Expression betrug in T-ALL-Zelllinien Faktor 1,1 bis 1,5.

In Primärzellen schwankte die relative miR-214 Expression von Faktor 0,3 (Pat 11) bis Faktor 2700 (Pat 2) und entsprach somit in etwa der Größenordnung der in den ALL-Zelllinien detektierten miR-214-Expression. Die einzigen *de novo*-T-ALL-Zellen (Pat 16) zeigten ähnlich wie die T-ALL-Zelllinien nur eine schwache miR-214-Expression im Vergleich zu T-Lymphozyten.

In Tabelle 18 sind spezifische Parameter der untersuchten Patienten wie Blastenanteil, Alter bei Diagnose und das Gesamtüberleben sowie die relative Expression der untersuchten miRs zusammengefasst. Ein möglicher Zusammenhang von miR-Expression und Überlebenszeit wurde

mittels der Kaplan-Meier-Methode untersucht. Die Ergebnisse dieser Überlebensstatistik sind in Abbildung 17 dargestellt. Keine der untersuchten miRs korrelierte in ihrer Expression signifikant mit dem Gesamtüberleben der untersuchten ALL-Patienten. Der Patient Pat08 wurde aus den Korrelationsstudien ausgeschlossen, da keine Angaben zu seinem Gesamtüberleben vorliegen.

Tabelle 18: Patientenkohorte der miR-Expressionsstudien.

Patient	Geschlecht Weiblich (W)/ Männlich (M)	Erkrankung	Blasten [%]	peripheres Blut (pB) / Knochenmark (KM)	Alter bei Diagnose [Jahre]	Gesamtüberleben nach Diagnose [d]	relative Expression		
							miR-126	miR-210	miR-214
Gesamtüberleben < 3 Monate									
Pat10	W	B-ALL	65,3	KM	50	47	72,6	7,3	12,3
Pat02	W	B-ALL	66,5	pB	85	48	7,5	8,9	2730,9
Pat14	W	B-ALL	93,2	pB	52	68	1,7	3,3	11,3
Pat15	M	B-ALL	40,8	pB	78	81	1,5	3,0	9,0
Gesamtüberleben 3 - 12 Monate									
Pat13	M	B-ALL	93,6	pB	84	99	37,1	3,3	7,4
Pat07	W	B-ALL	80,0	KM	19	162	49,5	0,4	4,5
Pat09	M	pro B-ALL	87,7	KM	44	209	17,4	6,8	2,3
Gesamtüberleben > 12 Monate									
Pat12	W	B-ALL	20,0	pB	56	426	18,4	1,00	1,4
Pat11	M	B-ALL	27,8	KM	43	568	28,6	0,7	0,3
Pat06	M	B-ALL	83,1	pB	47	896	14,1	9,71	5,72
Pat04	W	B-ALL	61,7	pB	21	1138	14,1	7,6	20,9
Pat03	M	B-ALL	61,7	KM	42	1201	288,6	21,4	62,9
Pat16	W	T-ALL	95, 8	KM	9	1256	9,9	13,5	3,5
Pat01	M	B-ALL	98,6	pB	64	1425	10,9	15,9	26,8
Pat05	M	B-ALL	87,8	KM	1	1567	30,5	5,0	24,6
Gesamtüberleben unbekannt									
Pat08	W	c-ALL	50,1	pB	75		29,8	4,1	4,7

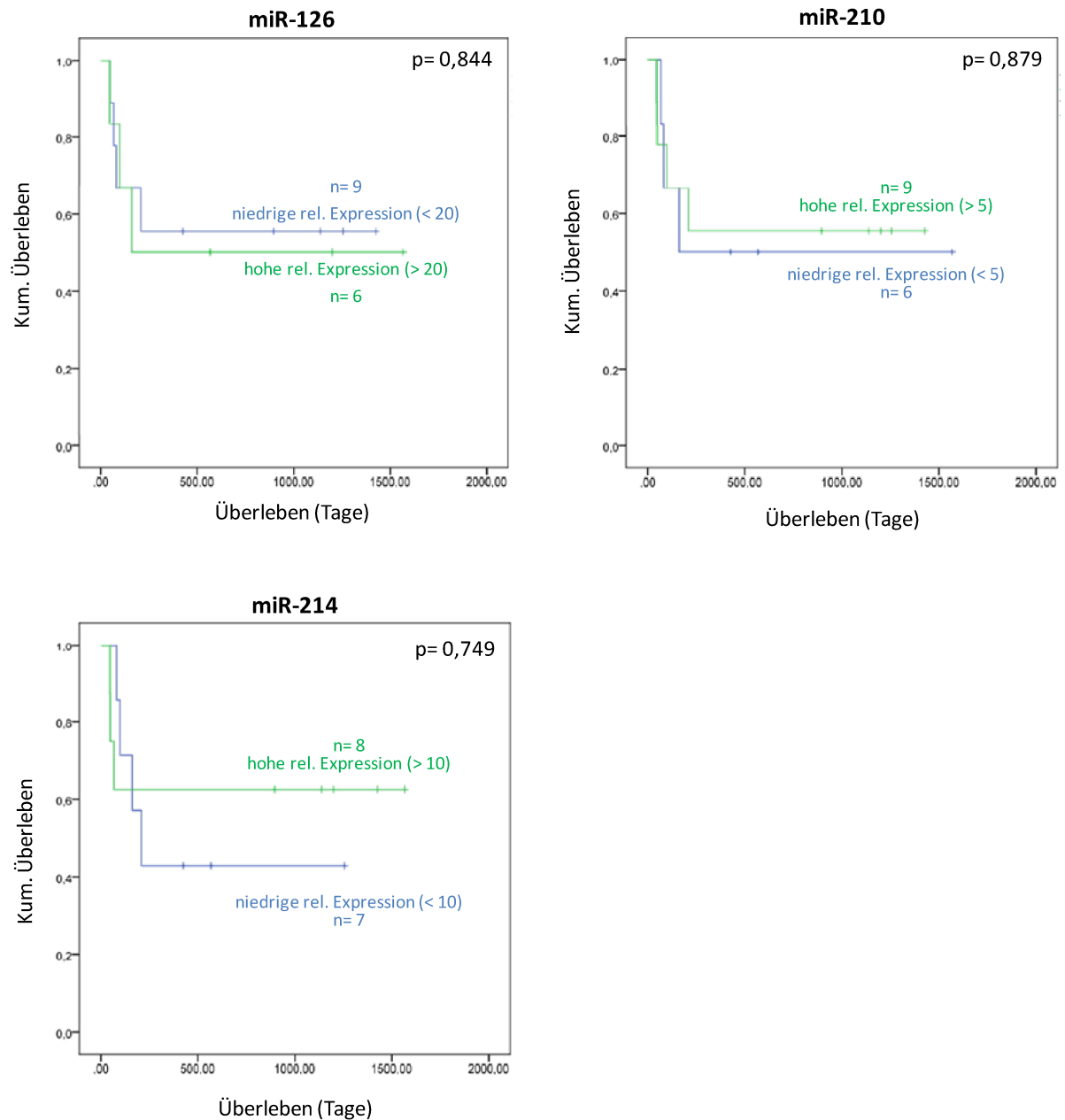


Abbildung 17: Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs von miR-Expression mit dem Gesamtüberleben von ALL-Patienten.

Die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ergab keinen statistischen Zusammenhang zwischen Expression der miR-126, -210 und -214 mit dem Überleben der untersuchten ALL-Patienten.

Zytogenetische Aberrationen der analysierten ALL-Patienten wurden durch das hämatologische Speziallabor der UMR mittels konventioneller Chromosomenanalyse und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung identifiziert [144] und sind im Anhang zusammengefasst (Tabelle 22).

4. DISKUSSION

4.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in ALL-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression essentieller Proteine des PI3K/Akt-Signalwegs in ALL-Zellen untersucht. In vier von sechs ALL-Zelllinien wurde eine stärkere Phosphorylierung der Kinase Akt an den Positionen Ser473 und Thr308 als in Kontrollzellen detektiert. Dies deutet auf eine aberrante Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in Zellen der ALL hin. Unter den B-ALL-Zelllinien zeigten SEM-Zellen die stärksten Akt-Phosphorylierungen, während unter den T-ALL-Zelllinien CEM-Zellen am stärksten phosphoryliert waren.

Der Aktivierungsstatus von Akt korreliert mit dem Level der Signalwegsaktivierung: je stärker die Phosphorylierung an Ser473 und Thr308, desto aktiver ist die Kinase [148].

Bereits zahlreiche andere Arbeiten konnten eine aberrante Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs bei der ALL belegen (zusammengefasst in [108]). Silva *et al.* zeigten in einer Arbeit aus dem Jahr 2008 eine aberrante Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in etwa 87,5 Prozent aller untersuchten T-ALL Patientenproben, determiniert durch erhöhte Akt-Phosphorylierungsspiegel und/oder mindestens einem Akt-Zielprotein im Vergleich zu T-Vorläuferzellen gesunder Personen [149]. Desweiteren wurden insbesondere bei T-ALLs häufig Deletionen des Tumorsuppressors PTEN nachgewiesen [106, 107, 149], die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektiert wurden (Daten im Anhang gezeigt, Abbildung 22). Auch in Primärzellen adulter B-ALL-Patienten wurde eine konstitutive Hyperaktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs identifiziert [150]. Die Phosphorylierung von Akt wird als charakteristisches Kennzeichen von B-Vorläufer ALLs beschrieben [151]. Intensive Studien unserer Arbeitsgruppe zur Hemmung der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels verschiedener Kinase-Inhibitoren zeigten vielversprechende Therapieansätze. Die Hemmung spezifischer Kinasen innerhalb der PI3K/Akt-Signalkaskade, z.B. eine Inhibition von mTOR (RAD001, NVP-BEZ235) oder PIK3K (NVP-BEZ235), induzierten eine Inhibition der Zellproliferation durch eine herabgesetzte metabolische Aktivität in den untersuchten ALL Zellen. Darüber hinaus konnte mittels Multikinase-Inhibitor Sorafenib eine Caspase-abhängige Induktion von Apoptose in ALL-Zellen induziert werden [110, 112, 152, 153].

Eines der Zielproteine von Akt, die Kinase GSK3 β , wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls hinsichtlich ihrer Expression sowie Phosphorylierung untersucht. Die Phosphorylierung von GSK3 β war in den untersuchten ALL-Zelllinien sehr heterogen und korrelierte nicht mit der Akt-Phosphorylierung.

Neben Akt [151] sind weitere Kinasen zu einer Phosphorylierung von GSK3 β an Position Ser9 befähigt [155], was auf einen übergreifenden *Crosstalk* zu anderen Signalwegen hindeutet.

GSK3 β ist eine zentrale Komponente des Wnt-Signalwegs und besonders die Interaktion des PI3K/Akt mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Kontext der ALL stand im Fokus der weiteren Untersuchungen.

4.2 PI3K/Akt – Wnt/ β -Catenin Interaktionen

4.2.1 *Signalwegsinteraktion entlang der Achse PI3K/Akt - Wnt/ β -Catenin*

In vier ALL-Zelllinien konnte durch eine Behandlung mit dem stimulieren Liganden des PI3K/Akt-Signalwegs (FLT3L) eine Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs induziert werden. In der Folge der Stimulation kam es zum Anstieg von β -Catenin, primär im Zytoplasma. Viele andere Arbeiten belegen die Existenz einer direkten Reaktionsachse: Akt phosphoryliert das Enzym GSK3 β , welches die β -Catenin-Stabilität reguliert [58, 154, 155]. Durch eine Akt-abhängige Inaktivierung von GSK3 β wird eine aminoterminal sequentielle Phosphorylierung von β -Catenin durch Proteine des Degradationskomplexes unterdrückt und dessen Abbau verhindert [156]. Vermutlich gelangt β -Catenin als Folge einer stabilisierenden Phosphorylierung durch Akt an Position Ser552 in den Nukleus und aktiviert dort die Expression zahlreicher Zielgene [157]. Diese durch Akt vermittelte Phosphorylierung bewirkt zudem die Ablösung gebundenen β -Catenins von Zell-Zell-Kontakten und führt zu einem vermehrten Vorliegen des Proteins im Zellinneren für die Signaltransduktion und Transkriptionsaktivierung [158].

Neben einer Stimulierung des PI3K/Akt-Signalwegs wurden auch eine Hemmung des Signalwegs und die in der Folge vermittelten Effekte auf β -Catenin untersucht. In allen mit dem Inhibitor behandelten ALL-Zelllinien wurde eine Abnahme von β -Catenin nachgewiesen. Diese Abnahme von β -Catenin als Folge der PI3K-Inhibition verläuft wahrscheinlich über eine Hemmung von Akt und eine verminderte Phosphorylierung des Enzyms GSK3 β [159], die in frühen Analysezeitpunkten nachgewiesen werden konnte. Unphosphoryliertes GSK3 β ist funktionell aktiv und kann im Zusammenschluss mit anderen Proteinen des β -Catenin-Abbaukomplexes die Phosphorylierung von β -Catenin vermitteln und so dessen Degradierung einleiten [159]. Entgegen der in dieser Arbeit durch LY294002-Behandlung nachgewiesenen Abnahme von β -Catenin, kam es in einer anderen Studie zu einem starken Anstieg von β -Catenin [160]. Diese Untersuchungen wurden an humanen Urothelzellen durchgeführt, die ebenfalls zu Interaktionsanalysen mit Liganden und Inhibitoren verschiedener Signalwege behandelt wurden und nach LY294002-Behandlung mit einem signifikanten Anstieg an besonders nukleärem, also aktivem, β -Catenin reagierten. Die Autoren begründeten ihre Beobachtungen mit einer LY294002-abhängigen Abnahme des Proteins E-Cadherin, welche mit einer verstärkten Freisetzung von β -Catenin und dessen Transport in den Zellkern verbunden war [160].

Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse durch sogenannte *off-target*-Effekte des Inhibitors verursacht wurden. Die verwendete Substanz LY294002 ist ein Agens, welches potentiell unerwünschte Sekundäreffekte verursacht. Verschiedene Arbeiten untermauern ein LY294002-vermitteltes Ansprechen anderer Signalkaskaden [161].

4.2.2 *Signalwegsinteraktion entlang der Achse Wnt/ β -Catenin – PI3K/Akt*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine differentielle Regulation von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalwegs durch Wnt3a-vermittelte Stimulation in zwei von sechs ALL-Zelllinien nachgewiesen. Dabei reagierte eine der beiden Zelllinien (RS4;11) mit einer Wnt3a-abhängigen Zunahme von sowohl pAkt (Ser473) als auch Gesamt-Akt, vermutlich über einen positiven Feedback-Loop.

In der anderen Zelllinie (MOLT-4) wurde nach Behandlung mit dem Liganden eine Abnahme von pAkt (Ser473) detektiert. Dies deutet auf das Vorliegen eines negativen Feedback-Loops hin.

Positive Feedback-Loops führen zur Amplifikation eines Signals, vermitteln also eine Steigerung der vermittelten Wirkungen. Negative Feedback-Loops sind charakterisiert durch alternierende Signale, die eine Feinjustierung ermöglichen und dadurch eine langfristige konstante Aktivität des Signals vermitteln und die Homöostase aufrecht erhalten [162].

Bisher liegen keine Publikationen zu Untersuchungen des Einflusses einer Wnt3a-Behandlung auf den PI3K/Akt-Signalweg in ALL-Zellen vor. In Zellen anderer Tumorentitäten wurden allerdings Daten generiert, die auf eine direkte Interaktion beider Signalwege hinweisen. Auch hier wurden positive als auch negative Rückkopplungsmechanismen beobachtet [160, 163-167].

In Prostatakrebszellen konnte eine Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs durch Modulation des kanonischen Wnt-Signalwegs induziert werden. Eine Überexpression von WIF1, welches Wnt-Bindungsstellen blockiert, induzierte in den behandelten Zellen eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung an Position Ser473 [163, 164]. Auch Fukumoto *et al.* wiesen in Zellen neuroendokriner Neoplasien durch Behandlung mit dem Liganden Wnt1 eine direkte Wnt-PI3K/Akt-Interaktion nach. Wnt1 induzierte zunächst eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs und parallel eine Aktivierung der Kinase Akt [166]. In murinen Fibroblastenzellen konnte mittels Wnt3a-Behandlung eine Zunahme der Akt-Phosphorylierungen an den Positionen Ser473 und Thr308 induziert werden [165]. Die vorgestellten Arbeiten beschreiben klassische positive *Feedback-Loops* ausgehend von einer Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

Ein negativer Feedback-Loop entlang der Achse Wnt - PI3K/Akt wurde in Leberzellkarzinom-Zelllinien nachgewiesen. GSK3 β -vermittelt kam es zur Aktivierung von FOXO (*Forkhead box O*)-Tumorrepressoren, welche in der Folge die Expression des IGF (*Insulin-like growth factor*)-Rezeptors stimulierten. Eine Zunahme der IGFR-Expression wiederum steigerte die Aktivität des PI3K/Akt-

Signalwegs, was zu einer Akt-vermittelten Inaktivierung von GSK3 β führte [167]. In einer anderen Arbeit induzierten Georgopoulos *et al.* durch *Knock-out* von β -Catenin einen signifikanten Anstieg von nukleärem phospho-Akt [160]. Auch diese Ergebnisse deuten auf eine negative Rückkopplung hin, da eine Hemmung des Wnt-Signalwegs eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelte. Daraus ergibt sich als Konsequenz ein alternierender Ablauf von Hemmung und Aktivierung der Signalwege.

Die Daten der vorgestellten Publikation sowie der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass eine gegenseitige Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit dem PI3K/Akt-Signalweg möglich, aber Zelltyp-spezifisch ist.

Die Tatsache, dass die beiden vorgestellten Signaltransduktionswege in ALL-Zellen miteinander in enger Verbindung stehen, könnte zukünftig bei der Entwicklung von neuen Therapiekonzepten von Bedeutung sein. Eine Schlüsselrolle des PI3K/Akt-Signalwegs für die Pathogenese der ALL wurde unlängst beschrieben [110, 112, 152, 153]. Verschiedene spezifische Hemmstoffe sowie Multikinase-Inhibitoren wurden bereits erfolgreich an ALL-Zellen getestet. Eine Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs korrelierte dabei mit einer Abnahme der Zellproliferation durch Induktion von Apoptose. In weiterführenden Studien könnte der Einfluss verschiedener anderer Wnt-Liganden und -Antagonisten auf die Expression und Phosphorylierung der Kinase Akt, sowie auf die Proliferation von ALL-Zellen untersucht werden.

4.3 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in ALL-Zellen

4.3.1 *Kaum aktiver Wnt-Signalweg in Zelllinien der ALL*

In der vorliegenden Arbeit wurden Schlüsselproteine des kanonischen Wnt-Signalwegs in allen untersuchten ALL-Zelllinien detektiert. Der Nachweis eines aktiven Wnt/ β -Catenin-Signalwegs über pLRP5(Ser1490) und unphosphoryliertes β -Catenin mittels Western Blot war zunächst negativ. In den stärker sensitiven Immunfluoreszenz-Analysen erfolgte eine Bestätigung dieser Ergebnisse, wenn gleich in einigen Zelllinien eine basal schwache β -Catenin-Expression im Zytoplasma und im Zellkern detektiert wurde. In der Positivkontrolle mit konstitutiv aktivem Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurden deutlich höhere β -Catenin-Spiegel als in allen untersuchten ALL-Zelllinien nachgewiesen. In B- und T- Lymphozyten gesunder Personen wurden wesentlich niedrigere, kaum detektierbare β -Catenin-Spiegel als in allen untersuchten ALL-Zelllinien detektiert. Daraus ergibt sich folgende Schlussfolgerung: der Wnt/ β -Cateinin-Signalweg ist in ALL-Zellen vermutlich nicht bis schwach aktiv. Diese Beobachtung ist konträr zu vielen Publikationen, die eine aberrante Aktivierung des Signalwegs in neoplastischen Zellen beschreiben und darin eine Schlüsselrolle für die Pathogenese vermuten. Dandekar *et al.* detektierten eine Überexpression des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zum

Zeitpunkt des Rezidivs in sechs von zehn Patienten der pädiatrischen ALL mittels Nachweises von aktiviertem β -Catenin und dem Zielgen *BIRC5* (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 5*) [168]. Wenige Arbeiten diskutieren einen inaktiven Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Kontext der Tumorenstehung oder -Progression [169-171]. In Studien an Osteosarkomen wurde in 90 Prozent der untersuchten primären Gewebeproben und 100 Prozent der untersuchten Zelllinien ein endogen inaktiver Wnt-Signalweg nachgewiesen. Eine Induktion der Signalwegsaktivierung führte zur Inhibition der Zellproliferation [169]. Eine tumorreprimierende Rolle des aktiven Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde ebenfalls von Matushansky *et al.* beschrieben. Die Studien an fibrösen Histiocyten zeigten eine Überexpression des Wnt-Inhibitors DKK-1 in den untersuchten Zellen. Die induzierte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermittelte eine Ausdifferenzierung der Tumorzellen [170]. Eine Inhibierung des Wnt-Signalwegs führte in Nacktmäusen zur Zelltransformation, und zur Entwicklung von Tumoren [170]. Chien *et al.* beschreiben den Zusammenhang des Verlusts von nukleärem β -Catenin mit der Progression maligner Melanome durch Dysregulation zellulärer Differenzierung und Homeostase. In der Studie korrelierte die nukleäre β -Catenin Expression mit längerem Überleben der Melanom-Patienten. Eine Wnt3a-vermittelte Induktion des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führte zur Zunahme der Genexpression typischer Marker von differenzierenden Melanozyten und zur Inhibierung der Proliferation von Melanomzellen [171].

Auch einige wenige Studien an ALL-Zellen untermauern die Ergebnisse der vorgestellten Publikation sowie der vorliegenden Arbeit. In einer Studie aus dem Jahr 2009 wurden verschiedene Leukämiezelllinien hinsichtlich ihrer β -Catenin-Expression untersucht. Analog zur vorliegenden Arbeit wurde endogen eine kaum nachweisbare β -Catenin Expression in den untersuchten Zelllinien detektiert [172]. Die selbe Arbeitsgruppe induzierte bereits in einer anderen Studie Wnt3a-vermittelt eine Aktivierung des basal kaum aktiven kanonischen Wnt-Signalwegs in B-ALL-Zellen und beobachtete antiproliferative Effekte durch Aktivierung der Signalkaskade [91].

Im Kontext mit den vorgestellten Publikationen über eine mögliche Wnt/ β -Catenin-Inaktivierung in Tumorentitäten wie Osteosarkomen und Melanomen untermauern diese Arbeiten an ALL-Zellen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten.

4.3.2 Limitationen einer induzierten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen

Vier von sechs untersuchte ALL-Zelllinien zeigten nach Stimulation mit dem Liganden Wnt3a eine Zunahme von Gesamt- β -Catenin sowie dessen Translokation in den Zellkern (vgl. Gruppen starke und intermediäre Wnt3a abhängige β -Catenin-Translokation). Diese Ergebnisse deuten auf die Wnt3a-induzierte Neusynthese von β -Catenin und die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade hin. Auch

die Mehrzahl der publizierten Studien beschreibt eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Wnt3a-Behandlung [91, 173, 174].

In zwei Zelllinien, REH und CEM, konnte weder eine signifikante Wnt3a-vermittelte Zunahme des Gesamtgehalts von β -Catenin, noch eine Translokation von β -Catenin in den Nukleus detektiert werden.

Ergänzend zu den Methoden Proteinfractionierung, Western Blot, und Immunfluoreszenz erfolgten Expressionsstudien nach Behandlung mit dem Liganden zur Ermittlung des Wnt-Aktivierungsstatus.

In Wnt3a-sensitiven Zelllinien konnte eine Aktivierung endständig der Signalkaskade, also auf Ebene der Wnt-Zielgene, nicht bestätigt werden. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte ein signifikanter Anstieg der Expression von universellen Wnt-Zielgenen nachgewiesen werden.

Den Ergebnissen der Expressionsstudien entsprechend, konnte eine Änderung der metabolischen Aktivität durch Wnt3a-Behandlung in Zelllinien der ALL nicht induziert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit an ALL-Zellen generierten Ergebnisse verschiedener funktioneller Analysen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs werden in Abbildung 18 zusammengefasst.

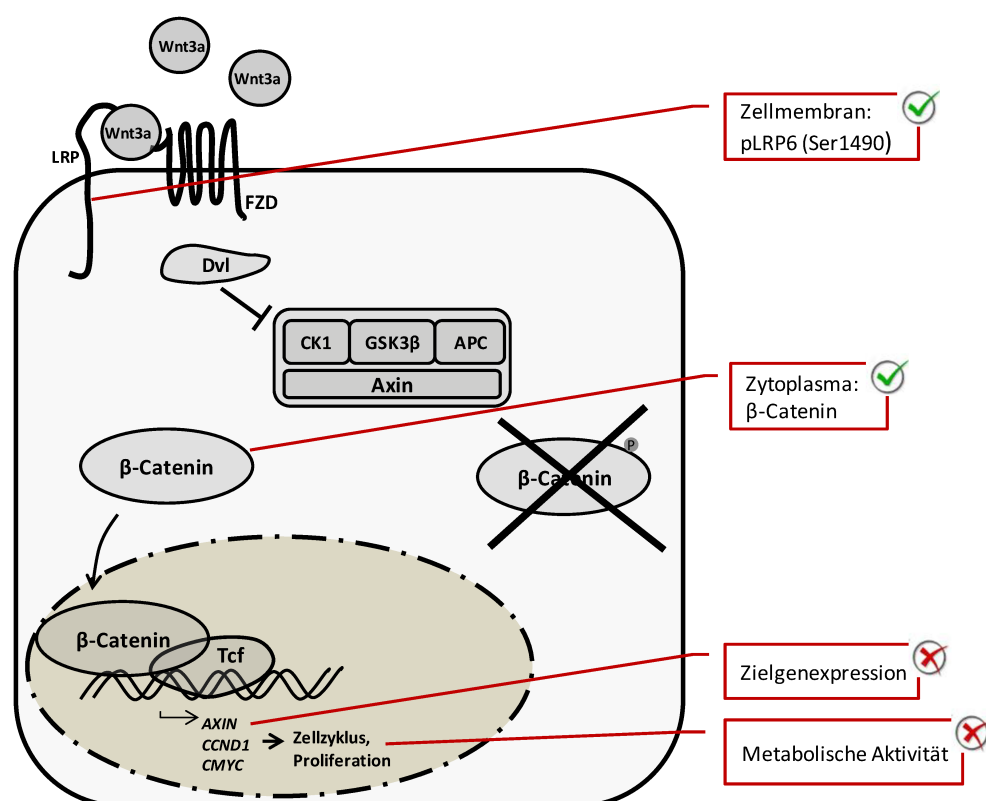


Abbildung 18: Atypische Wnt3a-induzierte Signalweiterleitung in ALL-Zelllinien.

Die Ergebnisse zum Einfluss von Wnt3a auf die metabolische Aktivität waren unter Berücksichtigung der bisher publizierten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unerwartet. Zahlreiche unabhängige Arbeiten beschreiben einen direkten Einfluss von Wnt3a auf die metabolische Aktivität und

Proliferation von Zellen. Wnt3a-abhängige proliferative Effekte werden über die vorgestellten universellen Wnt-Zielgene vermittelt, die wichtige regulatorische Bedeutung für den Zellzyklus besitzen [55, 174]. Ein direkter Zusammenhang zwischen aktiviertem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und Stimulation der Proliferation wurde unlängst beschrieben [91, 147, 174-176]. Nur wenige Arbeiten beschreiben eine Wnt3a-vermittelte Inhibierung der Proliferation [91, 177-179]. Unabhängige Studien deuten darauf hin, dass Wnt3a konzentrationsabhängig die Proliferation beeinflusst. Boer *et al.* formulierten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2004, dass geringe Wnt3a-Konzentrationen die Differenzierung osteogener Zellen inhibieren und die Proliferation von Vorläuferzellen stimulieren. Hohe Wnt3a-Konzentrationen dagegen stimulieren Differenzierungsprozesse [180]. Auch in einer Arbeit an Melanomzellen aus dem Jahr 2007 konnte ein Zusammenhang zwischen induzierter Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade und einer Hemmung der Zellproliferation detektiert werden [181]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten weder signifikante pro- noch antiproliferative Effekte durch Wnt3a-Behandlung in ALL-Zelllinien nachgewiesen werden. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entsprechend, detektierten auch Qiang *et al.* keine Wnt3a-vermittelte differentielle Änderung der Proliferation in Tumorzellen. In ihrer Studie aus dem Jahr 2008 wurde die Wirkungen des aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Zelllinien und Primärzellen multipler Myelome untersucht [173]. Die teils sehr konträren Publikationen hinsichtlich der Wirkungen eines aktivierten kanonischen Wnt-Signalwegs deuten auf einen Tumorentität-spezifischen Effekt dieser komplexen Signalkaskade hin. Diese Tatsache kann mit dem Vorliegen unterschiedlichster Phäno-, Geno- und Haplotypen begründet werden.

Wenn gleich die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten im Gegensatz zu vielen Publikationen stehen, so sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch in sich schlüssig, da mittels verschiedener unabhängiger Methoden analoge Ergebnisse generiert wurden.

4.3.3 *Hinweise eines aberrant inaktiven Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in ALL-Zellen: zytogenetische Analyse an den Beispielen REH und CEM*

Von allen untersuchten ALL-Zelllinien wiesen REH-Zellen die basal schwächste β -Catenin-Expression auf. Auch eine Behandlung mit Wnt3a konnte die β -Catenin-Expression nicht steigern. Gleiches traf auf die T-ALL-Zelllinie CEM zu, die trotz basal stärkerer β -Catenin Expression nicht merklich in ihrer β -Catenin-Synthese stimuliert werden konnte. Charakteristisch für diese zwei Wnt3a-nicht sensitiven ALL-Zelllinien REH und CEM sind komplexe zytogenetische Aberrationen. Viele davon betreffen unmittelbar Schlüsselproteine des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Die für sie kodierenden Gene sind auf den veränderten Chromosomenbereichen lokalisiert. Chromosomale Rearrangierungen, die wichtige Wnt/ β -Catenin-spezifischen Gene betreffen, konnten in den ALL-Zelllinien RS4;11, SEM, Jurkat und

MOLT-4 mittels zytogenetischer Karyotypisierung nicht nachgewiesen werden. (Dominante zytogenetische Aberrationen der Zelllinien RS4;11, SEM, REH und CEM sind im Anhang zusammengefasst, Abbildung 23 - 26).

Im Folgenden werden mögliche Ursachen eines aberranten Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in REH und CEM Zellen anhand chromosomaler Veränderungen vorgestellt und tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 19). Der Mehrzahl dieser aberranten Veränderungen ist gemein, dass sie sich zugunsten einer Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auswirken. Von starker Relevanz für die Wnt-Signaltransduktion der in REH und CEM-Zellen detektierten Aberrationen sind beispielsweise potentielle *PORCN* (*Porcupine*)- sowie *LRP6*-Deletionen oder ein Verlust des für den kanonischen Wnt-Signalweg zentralen Proteins β -Catenin.

Das auf dem X-Chromosom lokalisierte Gen *PORCN* kodiert für ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, welches an der Prozessierung von Wnt-Proteinen beteiligt ist [182]. Sowohl in REH als auch in CEM liegt ein Verlust des X-Chromosoms vor, sodass eine Störung der Biogenese von Wnt-Proteinen angenommen werden kann. In CEM Zellen wurde eine Deletion des Bereichs 12p12 nachgewiesen. Dieser befindet sich in unmittelbarer Nähe des *LRP6*-Gens an Position 12p13.2, sodass eine Beeinträchtigung dieses Wnt-Schlüsselproteins möglich ist. In REH-Zellen ist mit der chromosomalen Aberration del(3)(p22) ein für den kanonischen Wnt-Signalweg sehr wichtiger Bereich strukturell verändert: im Locus 3p22.1 befindet sich das Gen *CTNNB1*, welches für β -Catenin kodiert. Eine Deletion dieses Bereichs hat wahrscheinlich signifikanten Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg und setzt potentiell dessen Aktivität stark herab.

Das Vorliegen der veränderten Karyotypen könnte eine Ursache für die schwache Aktivierung der Wnt-Signalkaskade und das schlechte Ansprechen der Zelllinien auf Wnt3a darstellen.

Tabelle 19: Dominante zytogenetische Aberrationen und ihr möglicher Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg am Beispiel der ALL-Zelllinien REH und CEM.

REH			
Aberration	Betroffenes Gen (Genlokus)	Funktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg	verm. Effekt der Aberration auf Wnt/ β -Catenin-Signalweg
-X	<i>PORCN</i> (Xp11.23)	Aktivator	Hemmend
del(5)(q31)	<i>CK1</i> (5q32)	Repressor	Aktivierend
+16	<i>AXIN1</i> (16p13.3)	Repressor	Hemmend
del(3) (p22)	<i>CTNNB1</i> (3p22.1)	Aktivator	Hemmend
CEM			
Aberration	Betroffenes Gen (Genlokus)	Funktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg	verm. Effekt der Aberration auf Wnt/ β -Catenin-Signalweg
-X	<i>PORCN</i> (Xp11.23)	Aktivator	Hemmend
del(12)(?p12)	<i>LRP6</i> (12p13.2)	Aktivator	Hemmend
t(1;4)(?p32;?q21)	<i>DVL1</i> (1p36.3)	Aktivator	Aktivierend/Hemmend

4.3.4 Dominante zytogenetische Aberrationen und ein möglicher Zusammenhang mit der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion in ALL-Primärzellen

Bei den untersuchten *de novo*-ALL-Zellen wurden dominante zytogenetische Veränderungen identifiziert, die potentiell Auswirkungen auf den kanonischen Wnt-Signalweg besitzen. Gene mit möglichem Einfluss auf Wnt-Schlüsselproteine sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Zytogenetische Aberrationen bei *de novo*-ALL-Zellen und ein möglicher Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg.

Patient ID	Zytogenetik	<i>DVL1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>DVL3</i>	<i>FZD3</i>	<i>FZF6</i>	<i>LRP5</i>	<i>FZD4</i>	<i>LRP6</i>	<i>TCF3</i>	<i>PORCN</i>
		1p36.33	3p22.1	3q27.1	8p21.1	8q22.3	11q13.2	11q14.2	12p13.2	19p13.3	Xp11.23
01	inv(3)(p21;q26), der(7;8)(q10;q10), del(7)(q22), del(13)(q?14q31)		X	X							
06	t(4;11)(q21;q23), +X, -9, +21										X
07	del(12)(p13)								X		
10	t(9;22)(q34;q11.2), der(15), -19									X	
12	t(9;22)(q34;q11.2), +22, +6, +8, +11, +14, +21				X	X	X	X			
15	del(6)(q21-q23), del(11)(q21-q23), +1, +19, +21, +21	X								X	

Rot: chromosomale Veränderungen mit Einfluss auf Wnt-Signaltransduktion

Untersuchungen zum Aktivierungsstatus des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Western Blot oder Immunfluoreszenz wurden in den aufgeführten Primärzellen nicht durchgeführt. Limitierender Faktor war hier die gewonnene Zellzahl, die bei keinem der Patienten für diese weiterführenden Experimente ausreichte. Aus diesem Grund stellt die hier gewählte Darstellung eines möglichen Zusammenhangs der zytogenetischen Aberrationen mit einem möglicherweise fehlregulierten Wnt-Signalweg lediglich eine vage Vermutung dar.

4.4 Veränderte miR-Signatur in Zellen der ALL

4.4.1 Mögliche Deregulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch miR-214-Überexpression

Publizierte Daten deuten darauf hin, dass die miR-214 an einer Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beteiligt ist. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen wurde β -Catenin als potentielles Zielgen der miR-214 identifiziert und im Rahmen einer Studie an Zellen des Leberzellkarzinoms experimentell bestätigt [183]. Auch eine junge Arbeit an Keratinozyten bestätigte experimentell die β -Catenin-mRNA als miR-214-Zielsequenz und diskutiert diese spezifische miR als Schlüsselregulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [184]. Daten über eine direkte Beziehung der miR-214 mit β -Catenin in Leukozyten oder Leukämie-Zellen liegen aktuell nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der miR-214 in Lymphozyten und Zellen der B- und T-ALL analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war eine stark erhöhte miR-214-Expression in B-ALL-Zelllinien und *de novo*-ALL-Zellen. Diese aberrant hohe miR-214-Expression könnte mit den endogen niedrigen β -Catenin-Spiegeln in Zusammenhang gebracht werden, welche durch unabhängige Experimente und vielfältige Methoden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in ALL-Zellen nachgewiesen wurde. In den untersuchten B-ALL-Zellen war die Expression der miR-214 bis 10.000-fach im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht. Im Falle einer solch extremen Überexpression ist es durchaus möglich, dass die physiologische Signaltransduktion durch Repression oder Degradierung der β -Catenin-mRNA unterbunden wird [185, 186].

Ebenfalls denkbar ist eine Beeinflussung weiterer Signalwege, beispielsweise des PI3K/Akt-Signalwegs wie von Zou *et al.* beschrieben. Über Reporter-Gen-Assays identifizierte man den Tumorsuppressor PTEN als miR-214-Ziel-Transkript in CLL-Zellen und vermutet einen direkten Zusammenhang zur geringen PTEN-Expression [187].

4.4.2 Die Expression der miR-126 und miR-210 in ALL-Zellen

Weitere im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalysen umfassten die miR-126 und -210. Beide miRs wurden in sowohl ALL-Zelllinien als auch –Primärzellen stärker als in Kontrollzellen

exprimiert. Die detektierte Überexpression war heterogen. MiR-126 wurde vor allem in den untersuchten ALL-Zelllinien signifikant überexprimiert. Auch Giustacchini *et al.* identifizierten die miR-126 als für der ALL klinisch relevante miR. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Überexpression der miR-126 die Apoptoserate signifikant reduzierte und die Zelldifferenzierung auf Stufe der unreifen B-Lymphoblasten abstoppte. Der Mausstamm mit gesteigerter miR-126-Expression entwickelte signifikant häufiger B-Zell-Neoplasien als der entsprechende Kontroll-Mausstamm [188].

Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Überexpression der miR-210 war Primärzellen stärker ausgeprägt als in den untersuchten Zelllinien.

Während die miR-210 als regulative RNA eines spezifischen Transkriptionsfaktors endständig der Wnt-Signalkaskade in Adipozyten identifiziert wurde [130], liegen aktuell keine Daten über eine miR-126-vermittelte direkte Einflussnahme auf Proteine des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vor. Allerdings ist eine indirekte Regulation möglich, z.B. über andere, zwischengeschaltete Signalwege. So wurde beispielweise der Zusammenhang einer miR-126-Hemmung mit einer PI3K/Akt-Signalwegsaktivierung experimentell nachweisen, welche wahrscheinlich über das miR-126-Zielprotein p85 β erfolgt [122, 189]. Ein direkter Nachweis, dass die untersuchten miRs den PI3K/Akt- und/oder Wnt/ β -Catenin-Signalweg regulativ beeinflussen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen. Unter Berücksichtigung der teils sehr stark erhöhten miR-Expression sowohl in ALL-Zelllinien als auch in -Primärzellen, könnten weiterführende Studien zur Manipulation der miR-Expression aufschlussreiche Einblicke in die Funktionsweise von miRs im Kontext der ALL liefern.

4.5 Hypothetische Interpretation einer aberranten Inaktivierung des Wnt-Signalwegs

Unlängst ist bekannt, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Schlüsselposition im Prozess der Hämatopoese einnimmt. Proliferative und regulative Impulse des β -Catenin-abhängigen Signalwegs für die Biologie hämatopoetischer Stammzellen [65, 190], die Reifung von T-Zellen im Thymus [69, 190], sowie die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark [68] sind eindrucksvolle Beispiele dafür. Über die vermittelten distinkten zellulären Effekte existieren allerdings viele konträre Publikationen. Wenn gleich die Mehrheit der publizierten Daten auf einen proliferativen Effekt des aktiven Wnt-Signalwegs hindeutet [65, 79, 84, 89], so gibt es auch Publikationen, die inhibierende Wirkungen detektiert haben [66, 70, 91]. Diese konträren Beobachtungen sind möglicherweise durch eine konzentrations- und Zelltyp-abhängige Wirkung der Signalkaskade bedingt. Eine Konzentrations-Abhängigkeit des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde vielfach diskutiert und experimentell bestätigt [71, 191].

Ein anderer Ansatz zur Interpretation der generierten Daten verfolgt die Herausarbeitung der unterschiedlichen Zelltypen und ihrer Eigenschaften, insbesondere ihrer Lebenszeit und Organisation.

In der großen Mehrheit solider Tumoren gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen einer Re-Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und der Tumorphagenese. Eine solche Re-Aktivierung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in ALL-Zellen nicht nachgewiesen werden. In ALL-Zellen scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg kaum aktiv bzw. inaktiv zu sein. Auch die Induktion einer vollständigen Aktivierung bis zur letzten Ebene der Wnt-Zielgene war in den untersuchten ALL-Zellen nicht möglich.

Während, bis auf wenige Ausnahmen, die in Zellverbänden organisierten adhären Zellen eine sehr lange Lebenszeit haben, so erreichen die zirkulierenden Immunzellen des Bluts sehr viel eher ihr Lebensende und müssen im Laufe eines Lebens ständig nachgebildet werden [192-194].

Periphere mononukleäre Zellen des Bluts und Knochenmarks weisen die Besonderheit eines genetisch vorprogrammierten konstitutiven Zelltods auf. Diese natürlicherweise vorprogrammierte Apoptose bewirkt die kurze Lebensdauer der Zellen. Eine Fehlregulation dieser konstitutiven Apoptose kann eine Verzögerung des programmierten Zelltods bewirken und wird mit vielen Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht [192].

Durch die natürlicherweise starke Regeneration und das schnelle *Turnover* der Immunzellen werden hier Proliferations-unterstützende Signalwege, wie der Wnt/ β -Catenin Signalweg, in weitaus größerem Maße benötigt als in den adulten, ausdifferenzierten Zellen des Körpers. Unterbleibt diese frequentierte Präsenz des Wnt-Signalwegs in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, so könnte eine normale Hämatopoese durchaus beeinträchtigt werden.

Eine Schlüsselrolle des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs für die Reifung von B- und T-Lymphozyten ist unlängst bekannt [68, 195]. Die Aktivität des Wnt/ β -Catenin/Tcf1-Signalwegs ist in Thymozyten des DP (*double positive*)-Stadiums besonders hoch [196, 197]. Eine Überexpression stabilisierten β -Catenins stimulierte die Bildung von CD8-SP (*single positive*) T-Lymphozyten im Mausmodell [69], während eine Degradierung von β -Catenin über Axin-Überexpression einen Mangel an reifen und unreifen Thymozyten bewirkte [198]. Auch für die Reifung von B-Zellen ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg unerlässlich: Wnt-Proteine besitzen eine LEF1-abhängige mitogene Wirkung für pro-B-Zellen [68].

Potentiell könnte eine Differenzierung von Vorläuferzellen in spezifische reife Lymphozyten durch eine konstitutive Inaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs blockiert werden. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass eine aberrante Inaktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs mit dem Krankheitsbild der ALL assoziiert und an deren Entstehung maßgeblich beteiligt sein könnte.

Ein dritter Ansatz zur Interpretation der generierten Daten, die im Gegensatz zu vielen publizierten Daten stehen, ist die Co-Existenz anderer Veränderungen mit dem aberranten Wnt-Signalweg. So ist ein veränderter Wnt-Signalweg allein eventuell nicht ausschlaggebend für die Entstehung und Progression der ALL. Möglicherweise ist eine aberrante Wnt-Signalkaskade aber richtungsweisend und beeinflusst andere Signalwege, was in der Konsequenz das Fehlverhalten der Zellen begünstigt. So detektierte man in einer jungen Studie an Melanom-Zellen metabolische Reprogrammierungen und Mitochondrium-abhängige bioenergetische Änderungen in Zelllinien, die einen aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufwiesen. Diese geänderten Zellprozesse induzierten eine Inhibierung der Tumorprogression und so korrelierte ein aktiver Wnt-Signalweg mit einer günstigen Prognose. In Zelllinien, die neben induzierter Wnt/ β -Catenin-Aktivierung zusätzlich deletiert für PTEN waren, kam es zur Aufhebung dieser pro-apoptotischen Effekte [199].

Diesen Ansatz verfolgend, wird die Kenntnis über Mutationen und chromosomale Veränderungen bei ALL-Patienten zukünftig einen essentiellen Stellenwert einnehmen. Weiterführende Studien, die die Gesamtheit der vorliegenden Aberrationen betrachten und gegenseitige Rückkopplungen untersuchen, werden notwendig sein um krankheitsverursachende Mechanismen zu identifizieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zelluläre Signalwege, wie der PI3K/Akt- und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg, sind essentiell für Wachstum und Entwicklung von Zellverbänden beispielsweise im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung. Auch innerhalb der Hämatopoese übernehmen sie eine Schlüsselrolle und eine gestörte Signaltransduktion kann die Entstehung von humanen Leukämien begünstigen. Vor allem bei myeloischen Leukämien scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aberrant aktiv zu sein. Es gibt aktuell nur wenige Arbeiten, die die Wnt-Signaltransduktion im Kontext mit der ALL untersuchen. Die existierenden Daten sind zudem kontrovers.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher mit der Charakterisierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade bei der der ALL. In diesem Zusammenhang sollte vor allem der Aktivierungsstatus der Wnt-Signaltransduktion in Zellen der ALL ermittelt werden. Darüberhinaus sollte die Bedeutung des Signalwegs über Inhibitions- und Stimulationsanalysen evaluiert werden. Die Expressionsanalyse dreier regulativer miRs diente der Untersuchung möglicher posttranskriptionaler Genregulation.

Die Untersuchungen ergaben, dass Schlüsselproteine des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in allen untersuchten B- und T-ALL Zelllinien exprimiert werden. Die untersuchten ALL-Zellen wiesen eine heterogene β -Catenin-Expression auf. In Zellen mit hohen β -Catenin-Spiegeln war die Expression auf das Zytoplasma beschränkt. Andere Zelllinien zeigten nur eine schwache bis keine β -Catenin-Expression. Aktives β -Catenin (nicht-phosphoryliertes Protein) war in keiner der untersuchten ALL-Zelllinien nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf einen endogen schwach aktiven β -Catenin-Signalweg in ALL-Zellen hin. Eine Stimulation mit dem Liganden Wnt3a bewirkte eine Translokation von β -Catenin aus dem Zytoplasma in den Zellkern, hatte aber weder Einfluss auf die Transkription universeller Zielgene des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs noch auf den Metabolismus von ALL-Zellen. Auch eine Stimulierung der Wnt-Signalkaskade seitens Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels FLT3 Ligand war in ALL-Zellen möglich und verdeutlicht die Vernetzung der beiden Signalwege.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegen eine häufig diskutierte und initial angenommene aberrante Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Zusammenhang mit der ALL-Biologie.

Die vorliegende Arbeit deutet auf die Existenz Wnt/ β -Catenin-inaktivierender Aberrationen in einigen ALL-Zellen hin und diskutiert mögliche Ansätze der sich für die Immunzellen daraus ergebenden Defekte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in ALL-Zelllinien und *de novo*-Zellen eine teils extrem starke Expression dreier regulativer miRs identifiziert. Diese sind möglicherweise ursächlich für das Vorliegen des inaktiven Wnt-Signalwegs. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg besitzt eine Schlüsselstellung während der Reifung von Leukozyten und eine deregulierte Wnt-

Signaltransduktion begünstigt möglicherweise die Entstehung der ALL. In den vergangenen Jahren wurden mittels molekularbiologischer Methoden Tumor-assoziierte *Hot-spot*-Mutationen identifiziert. Solche Mutationen sind häufig Prognose- und Therapie-hinweisend und stellen einen essentiellen Faktor im Rahmen einer individualisierten Therapie von ALL-Patienten dar. Gene der Wnt-Signalkaskade scheinen häufig durch chromosomale Aberrationen dereguliert zu sein und sollten zukünftig hinsichtlich Prognosebewertung und Therapieansprechen charakterisiert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Gökbuget, N., and Ottmann, O. (2012). Aktuelle Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Der Onkologe* 18, 1093-1104.
2. Hoelzer, D., and Gökbuget, N. (2006). Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. *Der Onkologe* 12, 983-1002.
3. Wartenberg, D., Groves, F.D., and Adelman, A.S. (2008). Acute lymphoblastic leukemia: epidemiology and etiology. In *Acute Leukemias*. (Springer), pp. 77-93.
4. Tasian, S.K., Loh, M.L., and Hunger, S.P. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics Into Therapy. *Cancer* 121, 3577-3590.
5. Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annual Review Genetics*, Vol 45 45, 167-202.
6. Onozawa, M., and Aplan, P.D. (2012). Illegitimate V(D)J recombination involving nonantigen receptor loci in lymphoid malignancy. *Genes Chromosomes & Cancer* 51, 525-535.
7. Kasai, M., Aoki, K., Matsuo, Y., Minowada, J., Maziarz, R.T., and Strominger, J.L. (1994). RECOMBINATION HOTSPOT ASSOCIATED FACTORS SPECIFICALLY RECOGNIZE NOVEL TARGET SEQUENCES AT THE SITE OF INTERCHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN T-ALL PATIENTS WITH T(8-14)(Q24-Q11) AND T(1-14)(P32-Q11). *International Immunology* 6, 1017-1025.
8. Martinelli, G., Terragna, C., Amabile, M., Montefusco, V., Testoni, N., Ottaviani, E., de Vivo, A., Mianulli, A., Saglio, G., and Tura, S. (2000). Alu and transposon recognition site sequences flanking translocation sites in a novel type of chimeric bcr-abl transcript suggest a possible general mechanism for bcr-abl breakpoints. *Haematologica* 85, 40-46.
9. Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 23, 6306-6315.
10. Harrison, C.J. (2013). Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology-American Society of Hematology Education Program*, 118-125.
11. Foà, R., Chiaretti, S., Guarini, A., and Vitale, A. (2009). Adult acute lymphoblastic leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31, 41-47.
12. Gleissner, B., Gökbuget, N., Bartram, C.R., Janssen, B., Rieder, H., Janssen, J.W.G., Fonatsch, C., Heyll, A., Voliotis, D., Beck, J., et al. (2002). Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99, 1536-1543.
13. Roos, G., Kroeber, A., Grabowski, P., Kienle, D., Buehler, A., Doehner, H., Rosenquist, R., and Stilgenbauer, S. (2008). Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111, 2246-2252.
14. Carulli, G., Marini, A., Ferreri, M.L., Azzara, A., Ottaviano, V., Lari, T., Rocco, M., Giuntini, S., and Petrini, M. (2012). B-cell acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23) in a young woman: evolution into mixed phenotype acute leukemia with additional chromosomal aberrations in the course of therapy. *Hematology reports* 4, e15-e15.
15. Garg, R., Kantarjian, H., Thomas, D., Faderl, S., Ravandi, F., Lowshe, D., Pierce, S., and O'Brien, S. (2009). Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia and Translocation (1;19) Abnormality Have a Favorable Outcome With Hyperfractionated Cyclophosphamide, Vincristine, Doxorubicin, and Dexamethasone Alternating With Methotrexate and High-Dose Cytarabine Chemotherapy. *Cancer* 115, 2147-2154.
16. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C.F., Pui, C.H., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 9, 1985-1989.

17. A. G. Freud (2011). Atlas of Peripheral Blood: The Primary Diagnostic Tool, Volume 1, (Lippincott Raven: Irma Pereira, Tracy I. George, Daniel A. Arber).
18. Schneider, N.R., Carroll, A.J., Shuster, J.J., Pullen, D.J., Link, M.P., Borowitz, M.J., Camitta, B.M., Katz, J.A., and Amylon, M.D. (2000). New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group report of 343 cases. *Blood* 96, 2543-2549.
19. Ballerini, P., Blaise, A., Coniat, M.B.L., Su, X.Y., Zucman-Rossi, J., Adam, M., van den Akker, J., Perot, C., Pellegrino, B., Landman-Parker, J., et al. (2002). HOX11L2 expression, defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 100, 991-997.
20. Kikuchi, A., Hayashi, Y., Kobayashi, S., Hanada, R., Moriwaki, K., Yamamoto, K., Fujimoto, J., Kaneko, Y., and Yamamori, S. (1993). CLINICAL-SIGNIFICANCE OF TAL1 GENE ALTERATION IN CHILDHOOD T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC-LEUKEMIA AND LYMPHOMA. *Leukemia* 7, 933-938.
21. Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 59-88.
22. Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 781-810.
23. Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome biology* 3, REVIEWS3001-REVIEWS3001.
24. van Amerongen, R., Mikels, A., and Nusse, R. (2008). Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors. *Science Signaling* 1.
25. Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
26. Ng, O.H., Erbilgin, Y., Firtina, S., Celkan, T., Karakas, Z., Aydogan, G., Turkkan, E., Yildirmak, Y., Timur, C., Zengin, E., et al. (2014). Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal* 4.
27. Hausmann, G., and Basler, K. (2006). Wnt lipid modifications: Not as saturated as we thought. *Developmental Cell* 11, 751-752.
28. Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N., and Aaronson, S.A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes & Development* 24, 2517-2530.
29. Luis, T.C., Naber, B.A.E., Fibbe, W.E., van Dongen, J.J.M., and Staal, F.J.T. (2010). Wnt3a nonredundantly controls hematopoietic stem cell function and its deficiency results in complete absence of canonical Wnt signaling. *Blood* 116, 496-497.
30. Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K.P., Staal, F.J.T., Gerstein, R., and Kincade, P.W. (2008). Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *Journal of Immunology* 181, 3955-3964.
31. Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
32. Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y.S., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.
33. Jeon, H., and Blacklow, S.C. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annual Review of Biochemistry* 74, 535-562.
34. Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., and Skarnes, W.C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-538.
35. Gong, Y.Q., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H.W., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., et al. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523.
36. Fujino, T., Asaba, H., Kang, M.J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D.H., Ioka, R.X., Ono, M., Tomoyori, H., et al. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is

- essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 229-234.
37. Kelly, O.G., Pinson, K.I., and Skarnes, W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* **131**, 2803-2815.
 38. Yoshino, K., Rubin, J.S., Higinbotham, K.G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S.Y., and Perantoni, A.O. (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mechanisms of Development* **102**, 45-55.
 39. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., and DeRobertis, E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-756.
 40. Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-436.
 41. Bafico, A., Liu, G.Z., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nature Cell Biology* **3**, 683-686.
 42. Willert, K., and Nusse, R. (1998). beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 95-102.
 43. Hart, M., Concordet, J.P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., et al. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Current Biology* **9**, 207-210.
 44. Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-Catenin Signaling and Disease. *Cell* **149**, 1192-1205.
 45. Henderson, B.R., and Fagotto, F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *Embo Reports* **3**, 834-839.
 46. Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.-T., Lee, H.-T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., et al. (2011). FoxM1 Promotes beta-Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell* **20**, 427-442.
 47. Wiechens, N., Heinle, K., Englmeier, L., Schohl, A., and Fagotto, F. (2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of axin, a negative regulator of the Wnt-beta-catenin pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5263-5267.
 48. Henderson, B.R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nature Cell Biology* **2**, 653-660.
 49. Lancaster, M.A., Louie, C.M., Silhavy, J.L., Sintasath, L., DeCambre, M., Nigam, S.K., Willert, K., and Gleeson, J.G. (2009). Impaired Wnt-beta-catenin signaling disrupts adult renal homeostasis and leads to cystic kidney ciliopathy. *Nature Medicine* **15**, 1046-U1101.
 50. Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., and Henderson, B.R. (2012). Specific Armadillo Repeat Sequences Facilitate beta-Catenin Nuclear Transport in Live Cells via Direct Binding to Nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 819-831.
 51. Behrens, J., vonKries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-642.
 52. Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., and Clevers, H. (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 1248-1256.
 53. Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**.
 54. Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.

55. Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
56. Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L.Q., Schroeder, M., Liu, S.X., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & Development* 17, 1115-1129.
57. Hovanes, K., Li, T.W.H., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Marsh, J.L., Holcombe, R.F., and Waterman, M.L. (2001). beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics* 28, 53-57.
58. Filali, M., Liu, X.M., Cheng, N.L., Abbott, D., Leontiev, V., and Engelhardt, J.F. (2002). Mechanisms of submucosal gland morphogenesis in the airway. *Mucus Hypersecretion in Respiratory Disease* 248, 38-50.
59. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
60. Furuuchi, K., Tada, M., Yamada, H., Kataoka, A., Furuuchi, N., Hamada, J., Takahashi, M., Todo, S., and Moriuchi, T. (2000). Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers. *American Journal of Pathology* 156, 1997-2005.
61. Bjoerklund, P., Svedlund, J., Olsson, A.-K., Akerstroem, G., and Westin, G. (2009). The Internally Truncated LRP5 Receptor Presents a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Plos One* 4.
62. Fuerer, C., Nusse, R., and ten Berge, D. (2008). Wnt signalling in development and disease - Max Delbruck center for molecular medicine meeting on Wnt signaling in development and disease. *Embo Reports* 9, 134-138.
63. de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., et al. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8847-8851.
64. Lento, W., Congdon, K., Voermans, C., Kritzik, M., and Reya, T. (2013). Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
65. Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
66. Dosen, G., Tenstad, E., Nygren, M.K., Stubberud, H., Funderud, S., and Rian, E. (2006). Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *Bmc Immunology* 7.
67. Ranheim, E.A., Kwan, H.C.K., Reya, T., Wang, Y.K., Weissman, I.L., and Francke, U. (2005). Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* 105, 2487-2494.
68. Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15-24.
69. Mulroy, T., Xu, Y.Y., and Sen, J.M. (2003). beta-Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *International Immunology* 15, 1485-1494.
70. Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2, 274-283.
71. Luis, T.C., Ichii, M., Brugman, M.H., Kincade, P., and Staal, F.J.T. (2012). Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* 26, 414-421.
72. Mikesch, J.H., Steffen, B., Berdel, W.E., Serve, H., and Mueller-Tidow, C. (2007). The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 1638-1647.
73. Muller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Kohler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., et al. (2004). Translocation products in acute myeloid

- leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2890-2904.
74. Kajiguchi, T., Chung, E.J., Lee, S., Stine, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Levis, M.J., Neckers, L., and Trepel, J.B. (2007). FLT3 regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 21, 2476-2484.
 75. Tickenbrock, L., Schwable, J., Wiedehage, M., Steffen, B., Sargin, B., Choudhary, C., Brandts, C., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2005). Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood* 105, 3699-3706.
 76. Valencia, A., Roman-Gomez, J., Cervera, J., Such, E., Barragan, E., Bolufer, P., Moscardo, F., Sanz, G.F., and Sanz, M.A. (2009). Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23, 1658-1666.
 77. Jost, E., Schmid, J., Wilop, S., Schubert, C., Suzuki, H., Herman, J.G., Osieka, R., and Galm, O. (2008). Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 142, 745-753.
 78. Memarian, A., Hojjat-Farsangi, M., Asgarian-Omran, H., Younesi, V., Jeddi-Tehrani, M., Sharifian, R.A., Khoshnoodi, J., Razavi, S.M., Rabbani, H., and Shokri, F. (2009). Variation in WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 50, 2061-2070.
 79. Lu, D.S., Zhao, Y.D., Tawatao, R., Cottam, H.B., Sen, M., Leoni, L.M., Kipps, T.J., Corr, M., and Carson, D.A. (2004). Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3118-3123.
 80. Chim, C.S., Pang, R., and Liang, R. (2008). Epigenetic dysregulation of the Wnt signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of Clinical Pathology* 61, 1214-1219.
 81. Moskalev, E.A., Luckert, K., Vorobjev, I.A., Mastitsky, S.E., Gladkikh, A.A., Stephan, A., Schrenk, M., Kaplanov, K.D., Kalashnikova, O.B., Poetz, O., et al. (2012). Concurrent epigenetic silencing of wnt/beta-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Bmc Cancer* 12.
 82. Liu, T.H., Raval, A., Chen, S.S., Matkovic, J.J., Byrd, J.C., and Plass, C. (2006). CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research* 66, 653-658.
 83. Filipovich, A., Gandhirajan, R.K., Gehrke, I., Poll-Wolbeck, S.J., and Kreuzer, K.-A. (2010). Evidence for non-functional Dickkopf-1 (DKK-1) signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *European Journal of Haematology* 85, 309-313.
 84. Gandhirajan, R.K., Staib, P.A., Minke, K., Gehrke, I., Plickert, G., Schloesser, A.A., Schmitt, E., Hallek, M., and Kreuzer, K.-A. (2010). Small Molecule Inhibitors of Wnt/beta-Catenin/Lef-1 Signaling Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* 12, 326-U350.
 85. Petropoulos, K., Arseni, N., Schessl, C., Stadler, C.R., Rawat, V.P.S., Deshpande, A.J., Heilmeier, B., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S.K., et al. (2008). A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 205, 515-522.
 86. Liang, H.L., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., and Jones, S.N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4, 349-360.
 87. Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H.Y., Jung, S.H., Cook, J.M., Lagoo, A., and Rey, T. (2007). Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell* 12, 528-541.
 88. Guo, Z., Dose, M., Kovalovsky, D., Chang, R., O'Neil, J., Look, A.T., von Boehmer, H., Khazaie, K., and Gounari, F. (2007). beta-Catenin stabilization stalls the transition from double-

- positive to single-positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* 109, 5463-5472.
89. Chung, E.J., Hwang, S.G., Nguyen, P., Lee, S., Kim, J.S., Kim, J.W., Henkart, P.A., Bottaro, D.P., Soon, L., Bonvini, P., et al. (2002). Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. *Blood* 100, 982-990.
 90. Guo, W., Lasky, J.L., Chang, C.J., Mosessian, S., Lewis, X., Xiao, Y., Yeh, J.E., Chen, J.Y., Iruela-Arispe, M.L., Varella-Garcia, M., et al. (2008). Multi-genetic events collaboratively contribute to Pten-null leukaemia stem-cell formation. *Nature* 453, 529-U527.
 91. Nygren, M.K., Dosen, G., Hystad, M.E., Stubberud, H., Funderud, S., and Rian, E. (2007). Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *British Journal of Haematology* 136, 400-413.
 92. Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, J.C., MacDonald, H.R., Kemler, R., and Radtke, F. (2004). beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine* 199, 221-229.
 93. Jeannet, G., Scheller, M., Scarpellino, L., Duboux, S., Gardiol, N., Back, J., Kuttler, F., Malanchi, I., Birchmeier, W., Leutz, A., et al. (2008). Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. *Blood* 111, 142-149.
 94. Vara, J.A.F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* 30, 193-204.
 95. Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13513-13518.
 96. Faes, S., and Dormond, O. (2015). PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 21138-21152.
 97. Sharma, M., Chuang, W.W., and Sun, Z.J. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30935-30941.
 98. Zhang, J., Shemezis, J.R., McQuinn, E.R., Wang, J., Sverdllov, M., and Chenn, A. (2013). AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Development* 8.
 99. He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., et al. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nature Genetics* 39, 189-198.
 100. Shayesteh, L., Lu, Y.L., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics* 21, 99-102.
 101. Bellacosa, A., Defeo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M.H., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., et al. (1995). MOLECULAR ALTERATIONS OF THE AKT2 ONCOGENE IN OVARIAN AND BREAST CARCINOMAS. *International Journal of Cancer* 64, 280-285.
 102. Fumarola, C., Bonelli, M.A., Petronini, P.G., and Alfieri, R.R. (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical pharmacology* 90, 197-207.
 103. Tapia, O., Riquelme, I., Leal, P., Sandoval, A., Aedo, S., Weber, H., Letelier, P., Bellolio, E., Villaseca, M., Garcia, P., et al. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 465, 25-33.
 104. Neri, L.M., Cani, A., Martelli, A.M., Simioni, C., Junghanss, C., Tabellini, G., Ricci, F., Tazzari, P., Pagliaro, P., McCubrey, J.A., et al. (2014). Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia* 28, 739-748.

105. Zhao, W.L. (2010). Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia* 24, 13-21.
106. Gutierrez, A., Sanda, T., Grebliunaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L.A., Winter, S.S., et al. (2009). High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114, 647-650.
107. Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L., et al. (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nature Medicine* 13, 1203-1210.
108. Fransecky, L., Mochmann, L.H., and Baldus, C.D. (2015). Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Molecular and cellular therapies* 3, 2-2.
109. Paietta, E., Ferrando, A.A., Neuberg, D., Bennett, J.M., Racevskis, J., Lazarus, H., Dewald, G., Rowe, J.M., Wiernik, P.H., Tallman, M.S., et al. (2004). Activating FLT3 mutations in CD117/KIT+ T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 104, 558-560.
110. Schult, C., Dahlhaus, M., Glass, A., Fischer, K., Lange, S., Freund, M., and Junghanss, C. (2012). The Dual Kinase Inhibitor NVP-BE2235 in Combination with Cytotoxic Drugs Exerts Anti-proliferative Activity towards Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Anticancer Research* 32, 463-474.
111. Chiarini, F., Grimaldi, C., Ricci, F., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., Ognibene, A., Battistelli, M., Falcieri, E., Melchionda, F., Pession, A., et al. (2010). Activity of the Novel Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BE2235 against T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research* 70, 8097-8107.
112. Schult, C., Amoroso, F., Dahlhaus, M., Ruck, S., Lange, S., Buljubasic, F., Freund, M., Neri, L., and Junghanss, C. (2009). THE MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN INHIBITOR RAD001 INHIBITS PROLIFERATION OF T- AND B-LYMPHOBLASTIC CELLS VIA CELL CYCLE ARREST. *Haematologica-the Hematology Journal* 94, 0621.
113. Zhang, C., Ryu, Y.-K., Chen, T.Z., Hall, C.P., Webster, D.R., and Kang, M.H. (2012). Synergistic activity of rapamycin and dexamethasone in vitro and in vivo in acute lymphoblastic leukemia via cell-cycle arrest and apoptosis. *Leukemia Research* 36, 342-349.
114. Simioni, C., Neri, L.M., Tabellini, G., Ricci, F., Bressanin, D., Chiarini, F., Evangelisti, C., Cani, A., Tazzari, P.L., Melchionda, F., et al. (2012). Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 2336-2342.
115. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
116. Bartel, D.P. (2007). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell* 131, 11-29.
117. Xie, X.H., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., and Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434, 338-345.
118. Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m(7)G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
119. Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *PNAS* 105, 5343-5348.
120. Ben-Hamo, R., and Efroni, S. (2015). MicroRNA regulation of molecular pathways as a generic mechanism and as a core disease phenotype. *Oncotarget* 6, 1594-1604.
121. Parker, L.H., Schmidt, M., Jin, S.W., Gray, A.M., Beis, D., Pham, T., Frantz, G., Palmieri, S., Hillan, K., Stainier, D.Y.R., et al. (2004). The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. *Nature* 428, 754-758.
122. Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion. *Cell Stem Cell* 11, 799-811.

123. Liu, B., Peng, X.-C., Zheng, X.-L., Wang, J., and Qin, Y.-W. (2009). MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 66, 169-175.
124. Mocharla, P., Briand, S., Giannotti, G., Doerries, C., Jakob, P., Paneni, F., Luescher, T., and Landmesser, U. (2013). AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood* 121, 226-236.
125. Meister, J., and Schmidt, M.H.H. (2010). miR-126 and miR-126*: New Players in Cancer. *Thescientificworldjournal* 10, 2090-2100.
126. Zhu, N., Zhang, D., Xie, H., Zhou, Z., Chen, H., Hu, T., Bai, Y., Shen, Y., Yuan, W., Jing, Q., et al. (2011). Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. *Molecular and Cellular Biochemistry* 351, 157-164.
127. Huang, X., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2010). MiR-210-micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in Molecular Medicine* 16, 230-237.
128. Chan, S.Y., and Loscalzo, J. (2010). MicroRNA-210 A unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 9, 1072-1083.
129. Huang, X., Ding, L., Bennewith, K.L., Tong, R.T., Welford, S.M., Ang, K.K., Story, M., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Molecular Cell* 35, 856-867.
130. Qin, L.M., Chen, Y.S., Niu, Y.N., Chen, W.Q., Wang, Q.W., Xiao, S.Q., Li, A.N., Xie, Y., Li, J., Zhao, X., et al. (2010). A deep investigation into the adipogenesis mechanism: Profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Bmc Genomics* 11.
131. Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschlaeger, C., Wuerl, P., and Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *International Journal of Cancer* 126, 73-80.
132. Cho, W.C.S., Chow, A.S.C., and Au, J.S.K. (2009). Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *European Journal of Cancer* 45, 2197-2206.
133. Camps, C., Buffa, F.M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., Harris, A.L., Gleadle, J.M., and Ragoussis, J. (2008). hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 1340-1348.
134. Liu, S., Gao, S., Wang, X.Y., and Wang, D.B. (2012). Expression of miR-126 and Crk in endometriosis: miR-126 may affect the progression of endometriosis by regulating Crk expression. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 285, 1065-1072.
135. Malzkorn, B., Wolter, M., Liesenberg, F., Grzendowski, M., Stuehler, K., Meyer, H.E., and Reifenberger, G. (2010). Identification and Functional Characterization of microRNAs Involved in the Malignant Progression of Gliomas. *Brain Pathology* 20, 539-550.
136. Gee, H.E., Camps, C., Buffa, F.M., Colella, S., Sheldon, H., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., and Harris, A.L. (2008). MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature* 455.
137. Liu, J., Luo, X.-j., Xiong, A.-w., Zhang, Z.-d., Yue, S., Zhu, M.-s., and Cheng, S.Y. (2010). MicroRNA-214 Promotes Myogenic Differentiation by Facilitating Exit from Mitosis via Down-regulation of Proto-oncogene N-ras. *Journal of Biological Chemistry* 285, 26599-26607.
138. Takahashi, C., Contreras, B., Bronson, R.T., Loda, M., and Ewen, M.E. (2004). Genetic interaction between Rb and K-ras in the control of differentiation and tumor suppression. *Molecular and Cellular Biology* 24, 10406-10415.
139. Huang, H.-j., Liu, J., Hua, H., Li, S.-e., Zhao, J., Yue, S., Yu, T.-t., Jin, Y.-c., and Cheng, S.Y. (2014). MiR-214 and N-ras regulatory loop suppresses rhabdomyosarcoma cell growth and xenograft tumorigenesis. *Oncotarget* 5, 2161-2175.

140. Schwarzenbach, H., Milde-Langosch, K., Steinbach, B., Mueller, V., and Pantel, K. (2012). Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 134, 933-941.
141. Donato, R., Miljan, E.A., Hines, S.J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F.A., and Sinden, J.D. (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *Bmc Neuroscience* 8.
142. Vlad-Fiegen, A., Freytag, N.V., Dorn, S., Müller, O., and Eberth, S. (2016). The Wnt Pathway Target Gene CCND1 Changes Mitochondrial Localization and Decreases Mitochondrial Activity in Colorectal Cancer Cell Line SW480. *Journal of Biosciences and Medicines* 4, 132.
143. Koehler, T. (1995). General aspects and chances of nucleic acid quantitation by PCR. In *Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction*. (Springer), pp. 3-14.
144. Kiefer, T., Schueler, F., Knopp, A., Wimmer, M., Hirt, C., Schaefer, H.-E., and Doelken, G. (2007). A human Burkitt's lymphoma cell line carrying t(8;22) and t(14;18) translocations. *Annals of Hematology* 86, 821-830.
145. Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R.Y., Fujita, D.J., and Riabowol, K. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC research notes* 3, 294-294.
146. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
147. Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F., and Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406, 1009-1012.
148. Scheid, M.P., Marignani, P.A., and Woodgett, J.R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and Cellular Biology* 22, 6247-6260.
149. Silva, A., Yunes, J.A., Cardoso, B.A., Martins, L.R., Jotta, P.Y., Abecasis, M., Nowill, A.E., Leslie, N.R., Cardoso, A.A., and Barata, J.T. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *Journal of Clinical Investigation* 118, 3762-3774.
150. Margarida Gomes, A., Soares, M.V.D., Ribeiro, P., Caldas, J., Pova, V., Martins, L.R., Melao, A., Serra-Caetano, A., de Sousa, A.B., Lacerda, J.F., et al. (2014). Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. *Haematologica* 99, 1062-1068.
151. Badura, S., Tesanovic, T., Pfeifer, H., Wystub, S., Nijmeijer, B.A., Liebermann, M., Falkenburg, J.H.F., Ruthardt, M., and Ottmann, O.G. (2013). Differential Effects of Selective Inhibitors Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Plos One* 8.
152. Schult, C., Dahlhaus, M., Ruck, S., Sawitzky, M., Amoroso, F., Lange, S., Etro, D., Glass, A., Fuellen, G., Boldt, S., et al. (2010). The multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B- and T-lymphoblastic cells. *Bmc Cancer* 10.
153. Schult, C., Fischer, K., Dahlhaus, M., Goetz, M., Lange, S., Freund, M., and Junghanss, C. (2010). Concomitant treatment of Sorafenib with dexamethasone enhances antiproliferative effects in lymphoblastic cells. *Onkologie* 33, 236-236.
154. Kavitha, K., Kowshik, J., Kishore, T.K.K., Baba, A.B., and Nagini, S. (2013). Astaxanthin inhibits NF-kappa B and Wnt/beta-catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1830, 4433-4444.
155. Wu, K., Fan, J., Zhang, L., Ning, Z., Zeng, J., Zhou, J., Li, L., Chen, Y., Zhang, T., Wang, X., et al. (2012). PI3K/Akt to GSK beta/beta-catenin signaling cascade coordinates cell colonization for bladder cancer bone metastasis through regulating ZEB1 transcription. *Cellular Signalling* 24, 2273-2282.

156. Fernandez, J.G., Rodriguez, D.A., Valenzuela, M., Calderon, C., Urzua, U., Munroe, D., Rosas, C., Lemus, D., Diaz, N., Wright, M.C., et al. (2014). Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced beta-catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Molecular Cancer* 13.
157. Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, C.R., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M.C., et al. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging-Us* 3, 192-222.
158. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11221-11229.
159. Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 769-776.
160. Georgopoulos, N.T., Kirkwood, L.A., and Southgate, J. (2014). A novel bidirectional positive-feedback loop between Wnt-beta-catenin and EGFR-ERK plays a role in context-specific modulation of epithelial tissue regeneration. *Journal of Cell Science* 127, 2967-2982.
161. Kumar, N., Afeyan, R., Kim, H.-D., and Lauffenburger, D.A. (2008). Multipathway model enables prediction of kinase inhibitor cross-talk effects on migration of Her2-overexpressing mammary epithelial cells. *Molecular Pharmacology* 73, 1668-1678.
162. Thomas, R., Thieffry, D., and Kaufman, M. (1995). DYNAMICAL BEHAVIOR OF BIOLOGICAL REGULATORY NETWORKS .1. BIOLOGICAL ROLE OF FEEDBACK LOOPS AND PRACTICAL USE OF THE CONCEPT OF THE LOOP-CHARACTERISTIC STATE. *Bulletin of Mathematical Biology* 57, 247-276.
163. Ohigashi, T., Mizuno, R., Nakashima, J., Marumo, K., and Murai, M. (2005). Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells. *Prostate* 62, 61-68.
164. Yee, D.S., Tang, Y., Li, X., Liu, Z., Guo, Y., Ghaffar, S., McQueen, P., Atreya, D., Xie, J., Simoneau, A.R., et al. (2010). The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Molecular Cancer* 9.
165. Constantinou, T., Baumann, F., Lacher, M.D., Saurer, S., Friis, R., and Dharmarajan, A. (2008). SFRP-4 abrogates Wnt-3a-induced beta-catenin and Akt/PKB signalling and reverses a Wnt-3a-imposed inhibition of in vitro mammary differentiation. *Journal of molecular signaling* 3, 10-10.
166. Fukumoto, S., Hsieh, C.M., Maemura, K., Layne, R.D., Yet, S.F., Lee, K.H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W.G., Rubin, J.S., et al. (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through dishevelled. *Journal of Biological Chemistry* 276, 17479-17483.
167. Huo, X., Liu, S., Shao, T., Hua, H., Kong, Q., Wang, J., Luo, T., and Jiang, Y. (2014). GSK3 Protein Positively Regulates Type I Insulin-like Growth Factor Receptor through Forkhead Transcription Factors FOXO1/3/4. *The Journal of biological chemistry* 289, 24759-24770.
168. Dandekar, S., Romanos-Sirakis, E., Pais, F., Bhatla, T., Jones, C., Bourgeois, W., Hunger, S.P., Raetz, E.A., Hermiston, M.L., Dasgupta, R., et al. (2014). Wnt inhibition leads to improved chemosensitivity in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 167, 87-99.
169. Cai, Y., Mohseny, A.B., Karperien, M., Hogendoorn, P.C.W., Zhou, G., and Cleton-Jansen, A.-M. (2010). Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *Journal of Pathology* 220, 24-33.
170. Matushansky, I., Hernando, E., Socci, N.D., Mills, J.E., Matos, T.A., Edgar, M.A., Singer, S., Maki, R.G., and Cordon-Cardo, C. (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *Journal of Clinical Investigation* 117, 3248-3257.
171. Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling

- in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1193-1198.
172. Nygren, M.K., Dosen-Dahl, G., Stubberud, H., Walchli, S., Munthe, E., and Rian, E. (2009). beta-catenin is involved in N-cadherin-dependent adhesion, but not in canonical Wnt signaling in E2A-PBX1-positive B acute lymphoblastic leukemia cells. *Experimental Hematology* 37, 225-233.
 173. Qiang, Y.-W., Shaughnessy, J.D., Jr., and Yaccoby, S. (2008). Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth. *Blood* 112, 374-382.
 174. Khan, N.I., Bradstock, K.F., and Bendall, L.J. (2007). Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 138, 338-348.
 175. Derksen, P.W.B., Tjin, E., Meijer, H.P., Klok, M.D., Mac Gillavry, H.D., van Oers, M.H.J., Lokhorst, H.M., Bloem, A.C., Clevers, H., Nusse, R., et al. (2004). Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6122-6127.
 176. Wang, S.-H., Li, N., Wei, Y., Li, Q.-R., and Yu, Z.-P. (2014). similar to- catenin deacetylation is essential for WNT-induced proliferation of breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 9, 973-978.
 177. Qiu, W., Andersen, T.E., Bollerslev, J., Mandrup, S., Abdallah, B.M., and Kassem, M. (2007). Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 22, 1720-1731.
 178. Carthy, J.M., Garmaroudi, F.S., Luo, Z., and McManus, B.M. (2011). Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF-beta Signaling Through SMAD2 in a beta-Catenin-Dependent Manner. *Plos One* 6.
 179. Nam, J.-S., Chakraborty, C., Sharma, A.R., Her, Y., Bae, K.-J., Sharma, G., Doss, G.P., Lee, S.-S., Hong, M.-S., and Song, D.-K. (2014). Effect of Wnt3a on Keratinocytes Utilizing in Vitro and Bioinformatics Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 5472-5495.
 180. de Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R., and van Blitterswijk, C. (2004). Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 34, 818-826.
 181. Delmas, V., Beermann, F., Martinuzzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). beta-Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16(INK4a) expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & Development* 21, 2923-2935.
 182. Barrott, J.J., Cash, G.M., Smith, A.P., Barrow, J.R., and Murtaugh, L.C. (2011). Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12752-12757.
 183. Xia, H., Ooi, L.L.P.J., and Hui, K.M. (2012). MiR-214 Targets beta-Catenin Pathway to Suppress Invasion, Stem-Like Traits and Recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma. *Plos One* 7.
 184. Ahmed, M.I., Alam, M., Emelianov, V.U., Poterlowicz, K., Patel, A., Sharov, A.A., Mardaryev, A.N., and Botchkareva, N.V. (2014). MicroRNA-214 controls skin and hair follicle development by modulating the activity of the Wnt pathway. *Journal of Cell Biology* 207, 549-567.
 185. Yi, S.J., Li, L.L., and Tu, W.B. (2016). MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/beta-catenin signaling in breast cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20, 5148-5154.

186. Duan, Q., Wang, X., Gong, W., Ni, L., Chen, C., He, X., Chen, F., Yang, L., Wang, P., and Wang, D.W. (2012). ER Stress Negatively Modulates the Expression of the miR-199a/214 Cluster to Regulates Tumor Survival and Progression in Human Hepatocellular Cancer. *Plos One* 7.
187. Zou, Z.-J., Fan, L., Wang, L., Xu, J., Zhang, R., Tian, T., Li, J.-Y., and Xu, W. (2015). miR-26a and miR-214 down-regulate expression of the PTEN gene in chronic lymphocytic leukemia, but not PTEN mutation or promoter methylation. *Oncotarget* 6, 1276-1285.
188. Giustacchini, A., Nucera, S., Lechman, E.R., Fanciullo, C., Boccalatte, F.E., Plati, T., Ronghetti, A., Vago, L., Bernardi, M., Ponzoni, M., et al. (2013). A Mechanistic Role For Mir-126, a Hematopoietic Stem Cell Microrna, In Acute Leukemias. *Blood* 122.
189. Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., Ren, T., and Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17, 252-264.
190. Luis, T.C., Weerkamp, F., Naber, B.A.E., Baert, M.R.M., de Haas, E.F.E., Nikolic, T., Heuvelmans, S., De Krijger, R.R., van Dongen, J.J.M., and Staal, F.J.T. (2009). Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood* 113, 546-554.
191. Luis, T.C., Naber, B.A.E., Roozen, P.P.C., Brugman, M.H., de Haas, E.F.E., Ghazvini, M., Fibbe, W.E., van Dongen, J.J.M., Fodde, R., and Staal, F.J.T. (2011). Canonical Wnt Signaling Regulates Hematopoiesis in a Dosage-Dependent Fashion. *Cell Stem Cell* 9, 345-356.
192. McCracken, J.M., and Allen, L.-A.H. (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *Journal of cell death* 7, 15-23.
193. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with (H2O)-H-2 reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625-627.
194. Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., and Frisen, J. (2005). Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122, 133-143.
195. Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanusmaandag, E., Teriele, H., Vandewetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., Macdonald, H.R., and Clevers, H. (1995). AN HMG-BOX-CONTAINING T-CELL FACTOR REQUIRED FOR THYMOCYTE DIFFERENTIATION. *Nature* 374, 70-74.
196. Yu, Q., and Sen, J.M. (2007). β -catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *The Journal of Immunology* 178, 5028-5034.
197. Hossain, M.Z., Yu, Q., Xu, M., and Sen, J.M. (2008). ICAT expression disrupts β -catenin-TCF interactions and impairs survival of thymocytes and activated mature T cells. *International immunology* 20, 925-935.
198. Hsu, W., Shakya, R., and Costantini, F. (2001). Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *Journal of Cell Biology* 155, 1055-1064.
199. Brown, K., Yang, P., Salvador, D., Kulikaukas, R., Ruohola-Baker, H., Robitaille, A.M., Chien, A.J., Moon, R.T., and Sherwood, V. (2017). WNT/beta-catenin signaling regulates mitochondrial activity to alter the oncogenic potential of melanoma in a PTEN-dependent manner. *Oncogene* 36, 3119-3136.

7. ANHANG

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
<i>Liganden, Inhibitoren</i>		
DKK-1	R&D Systems	5439-DK
FLT3 Ligand	Amgen	8985-012
LY294002	Cell Signaling	9901
Wnt3a	R&D Systems	5036-WN
<i>Sonstiges</i>		
Albumin bovine Fraction V (BSA), pH 7.0	Serva	11930.03
β-Mercaptoethanol	Roth	4227.1
Bromphenolblau	Roth	A512.1
Chloroform	Roth	3313.4
Complete Mini EDTA-free Tabletten	Roche	4693159001
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Aldrich	D2650
dNTP-Mix	GE Healthcare	28-4065-51
Ethanol, 98% reinst	Universität Rostock, ZAP	
Ethanol, 98% vergällt	Universität Rostock, ZAP	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Aldrich	E7889
Glycin	Roth	3908.2
human-Albumin Kabi 20%	Octapharma	10542a/96
Methanol	J.T.Baker	9076-07
Milchpulver	Roth	T145.2
Natriumchlorid	Roth	3957.1
Natriumhydroxid	Merck	106462
Nonidet P40	Applichem	A1694,0250
Phosphat buffered saline (PBS), ph 7,4	Sigma-Aldrich-Aldrich	P3813-10PAK
PhosphoSTOP Tabletten	Roche	04906837001
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling	5872
SDS	SERVA Electrophoresis	20763
TEMED	Sigma-Aldrich-Aldrich	T-9281
TRIS	Roth	4855.2
TritonX-100	Sigma-Aldrich-Aldrich	T8532
Trypanblau	Sigma-Aldrich-Aldrich	T8154

7.1.2 Kits und Fertiglösungen

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
<i>Kits und Oligonukleotide</i>		
Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare	RPN2135
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
miRNeasy Mini Kit	Qiagen	217004
Primer		
LEF1	Life Technologies	4331182 (Hs01547250)
MYC	Life Technologies	4331182 (Hs00153408)
CCND1	Life Technologies	4331182 (HS00765553)
qPCR MasterMix Plus dNTP	Eurogentec	RT-QP2X-03+WOUN
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies	18064-014
TaqMan Micro RNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4366597
TaqMan MicroRNA Assays		
hsa-miR-126	Applied Biosystems	4427975
hsa-miR-210	Applied Biosystems	4427975
hsa-miR-214	Applied Biosystems	4427975
<i>Fertiglösungen</i>		
Biocoll	Biochrom	L6115
PBS	Biochrom	L1825
Ponceau S	SERVA Electrophoresis	33427
RIPA-Puffer (10 x)	Cell Signaling	9806
Roti-Mount FluorCare DAPI	Roth	HP20.1
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	Bio-Rad	161-0375
Restore Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific	46430
WST-1 Reagenz	Roche	11 644 807 001

7.1.3 Nährmedien und Antibiotika

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
alpha-MEM	Biochrom	F 0915
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA	A15-151
Iscove`s MDM mit L-Glutamin	Biochrom	FG 0465
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom	A2213
RPMI 1640	Biochrom	F 1215

7.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
RNA-free DNase Set	Qiagen	79254
Superscript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen	18064-014

7.1.5 Antikörper

Western Blot

Primärantikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
<i>PI3K/Akt-Signalweg</i>				
PI3 Kinase p85	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	4292
PI3 Kinase p110	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	4249
p-Akt (Thr308)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	4056
p-Akt (Ser473)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	4058
Akt	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9272
p-4EBP1 (Ser65)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9456
p-4EBP1 (Thr70)	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9455
4EBP1	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9452
p-p70 S6 Kinase (Thr389)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9234
p70 S6 Kinase	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2708
mTOR	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2983
p-PTEN (Ser380)	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9551
PTEN	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9559
<i>Wnt/β-Catenin-Signalweg</i>				
p-LRP6 (Ser1490)	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2568
LRP6	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2560
Dvl1	Monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-8025
Dvl2	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	3216
Dvl3	Monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-8027
Axin	Polyklonal	Kaninchen	Invitrogen	34-5900
CK1 α	Polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-6477
p-GSK3 β (Ser9)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9323
GSK3 β	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9315
np- β -Catenin	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	8814
	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	4270
β -Catenin	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9582
Tcf4	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2569
<i>endogene Kontrolle</i>				
GAPDH	Monoklonal	Maus	Invitrogen	39-8600
Histon H3	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	9715
Sekundärantikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
anti-Kaninchen IgG	Polyklonal	Ziege	Cell Signaling	7074
anti-Mouse IgG	Polyklonal	Ziege	Invitrogen	81-6520

Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
β -Catenin	Polyclonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-1496-R

Sekundärantikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
anti-Kaninchen IgG	Polyclonal	Ziege	Invitrogen	A-11070

Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
Maus IgG1	X40	Maus	BD Biosciences	345815
Maus IgG1	X40	Maus	BD Biosciences	345816
human CD3	SK7	Maus	BD Biosciences	345765
human HLA-DR	L243	Maus	BD Biosciences	347400
human CD45	2D1	Maus	BD Biosciences	345808
human CD11c	S-HCL-3	Maus	BD Biosciences	333149
human CD14	MφP9	Maus	BD Biosciences	345784
human CD3	SK7	Maus	BD Biosciences	345765
human CD19	4G7	Maus	BD Biosciences	345776
human CD45	2D1	Maus	BD Biosciences	345808
human CD34	8G12	Maus	BD Biosciences	345802
human CD33	P67.6	Maus	BD Biosciences	345799
human CD2	S5.2	Maus	BD Biosciences	347404

Microbeads für Zellseparation

MicroBead	Wirt	Hersteller	Bestellnummer
human CD34	Maus	Miltenyi Biotec	130-046-702
human CD3	Maus	Miltenyi Biotec	130-050-101
human CD19	Maus	Miltenyi Biotec	130-050-301

7.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Bestellnummer
12-Lochplatte, steril	Nunc	150628
24-Lochplatte, steril	Greiner	662160
48-Lochplatte, steril	Greiner	677180
6-Lochplatte, steril	Greiner	657160
96 Mikrotiterplatte	Applied biosystems	N801-0560
96-Lochplatte	Greiner	655001
96-Lochplatte, steril	Greiner	655180
Cytofunnel	Thermo Scienfific	1102548
Deckgläschen	Menzel Gläser	BB020020A1
Eppendorfgefäße		
2 ml	Eppendorf	0030.120.094
1,5 ml, einzeln verpackt	Eppendorf	0030.121.589
FACS-Röhrchen	BD Biosciences	352052
Fertiggele		
Criterion TGX Precast Gels, any kd, 12+2	Biorad	567-1123
Criterion TGX Precast Gels, any kd, 25 well	Biorad	567-1125

Kryoröhrchen	Nunc	375353
Objektträger	Thermo Scientific	59910051/M
Transferpacks		
Transblot Turbo Transfer Pack, Mini, 0,2µm PVDF	Biorad	170-4156
Transblot Turbo Transfer Pack, Midi, 0,2µm PVDF	Biorad	170-4157
Versiegelungsfolie	Applied biosystems	4311971
Zellkulturflaschen, 25 ml	Greiner	658175
Zellkulturflaschen, 50 ml	Greiner	690190

7.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Abzug captair	Erlab
Abzug vallox	x-line
Adhesive Seal Applicator	LifeTechnologies
BD FACSCalibur	Becton & Dickinson
Brutschrank BB6220 Cu	Heraeus Instruments
C 1000 Thermal Cycler	Biorad
Elektrophoresekammer Criterion	Biorad
Feinwaage A210P	sartorius analytic
FluoView FV10i	Olympus
Geldokumentationssystem	Herolab
Glomax Multi	Promega
Heizblock 2099-DA	Liebisch
Image Station 440	Kodak
Kühlschrank	Liebherr
Kühltruhe, -20 °C	Electrolux
Mikroskop Eclipse TE 200	Nikon
Multipette	Eppendorf
Nanodrop ND 100	Peqlab
Neubauerzählkammer	Marienfeld
pH-Meter seven-easy	Mettler Toledo
Schüttler	Heidolph Instruments
Sonopuls HD 2070	Bandelin
Sterile Werkbank Herasafe	Heraeus Instruments
Trans-Blot Turbo	Biorad
Vortexer	UniEQUIP
Waage Kern 572	Kern
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Beckman Avanti 30	Beckman
Zentrifuge Eppendorf 5418	Eppendorf
Zentrifuge Hettich Rotina 35 R	Hettich

7.2 Ergänzende Abbildungen

Tabelle 21: Gewinnung von Referenzzellen aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts.

n	Anzahl Spender	Menge pB	Zellzahl PBMCs	B-Zellen			T-Zellen		
				Ausbeute B-Zellen	Reinheit B-Zellen	B-Zellen für RNA/Protein	Ausbeute T-Zellen	Reinheit T-Zellen	T-Zellen für RNA/Protein
1	5	65 ml	$10,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	84,8 %	RNA-Pool 1	$2,1 \times 10^6$	97,4 %	RNA-Pool 1
2	5	90 ml	$11,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	97,6 %	RNA-Pool 2			
3	5	84 ml	$7,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	94,7 %	RNA-Pool 3			
4	4	150 ml	$12,9 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$	97,5 %	RNA-Pool 4	$31,3 \times 10^6$	98,6 %	RNA-Pool 2, Protein-Pool 1
5	8	180 ml	$15,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	96,9 %	RNA-Pool 5			
6	4	180 ml	$36,3 \times 10^7$	$12,0 \times 10^6$	96,1 %	RNA-Pool 6, Protein-Pool 1	$71,0 \times 10^6$	98,9 %	RNA-Pool 3, Protein-Pool 2/3/4
7	5	78 ml	$11,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	95,4 %	Protein-Pool 2	$29,7 \times 10^6$	99,7 %	RNA-Pool 4, Protein-Pool 5
8	5	90 ml	$14,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	95,5 %	Protein-Pool 3	$31,0 \times 10^6$	99,7 %	RNA-Pool 5, Protein-Pool 6
9	4	150 ml	$15,8 \times 10^7$	$6,8 \times 10^6$	95,4 %	Protein-Pool 4			
10	4	150 ml	$24,5 \times 10^7$	$12,6 \times 10^6$	93,4 %	Protein-Pool 5	$58,5 \times 10^6$	99 %	Protein-Pool 7/8
11	7	330 ml	$34,2 \times 10^7$	$24,1 \times 10^6$	97,9 %	Protein-Pool 6			

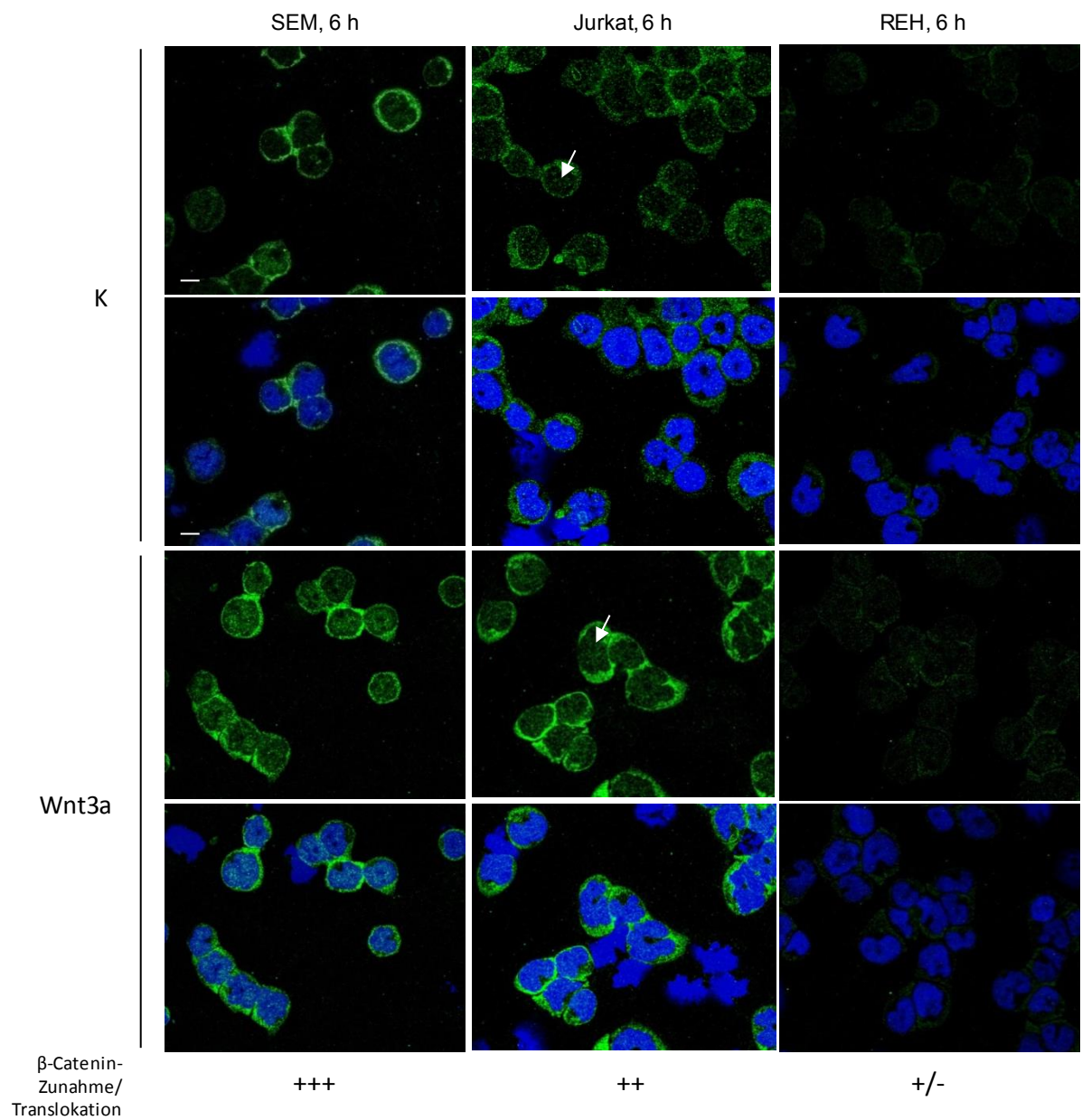


Abbildung 19: β-Catenin-Nachweis nach Wnt3a-Behandlung in den SEM, Jurkat und REH.

Grün: β-Catenin, blau: DAPI. Maßstab 10 µm

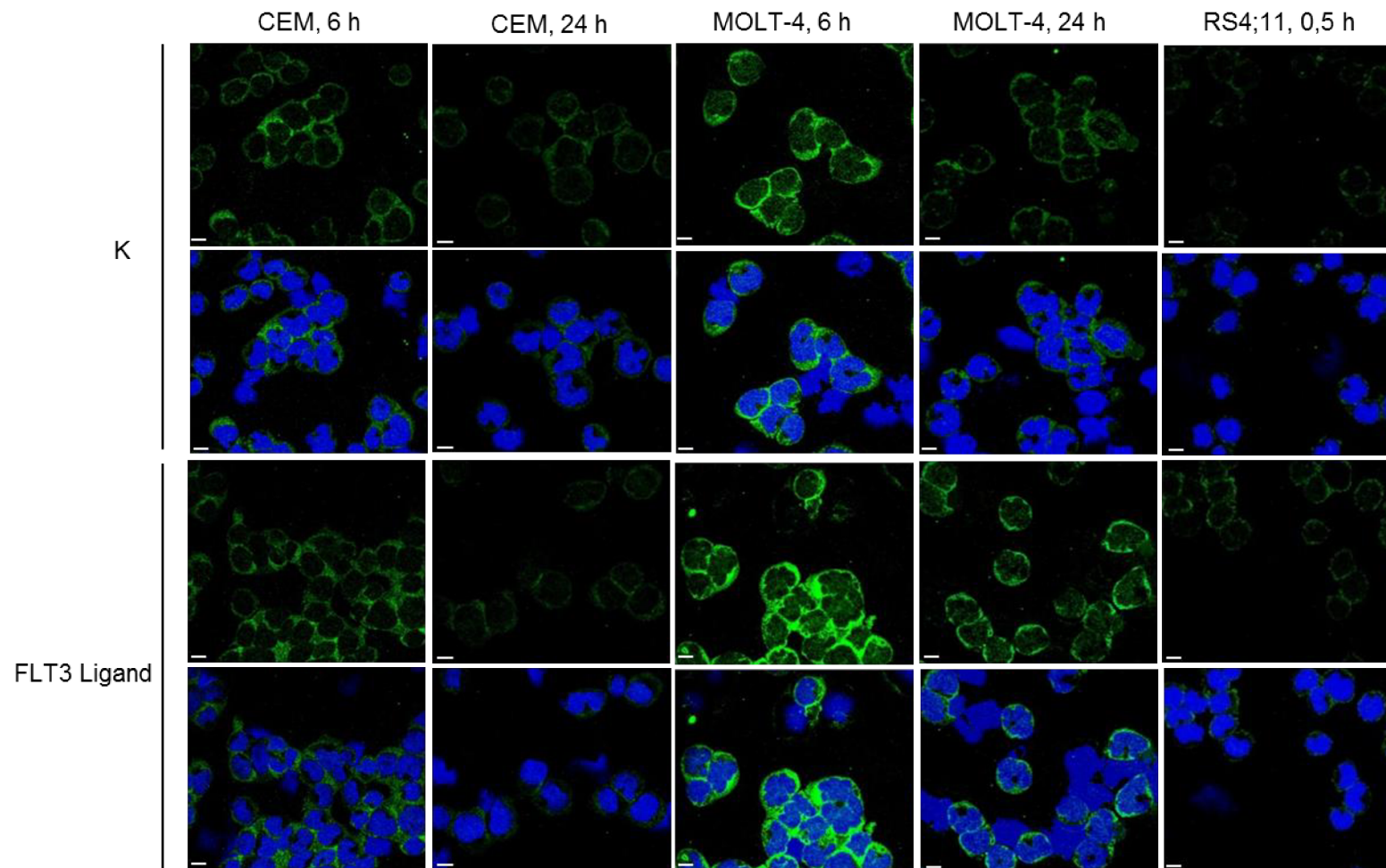


Abbildung 20: Nachweis von β -Catenin nach FLT3 Ligand-Behandlung in CEM, MOLT-4 und RS4;11.

Grün: β -Catenin, blau: DAPI. Maßstab 10 μ m

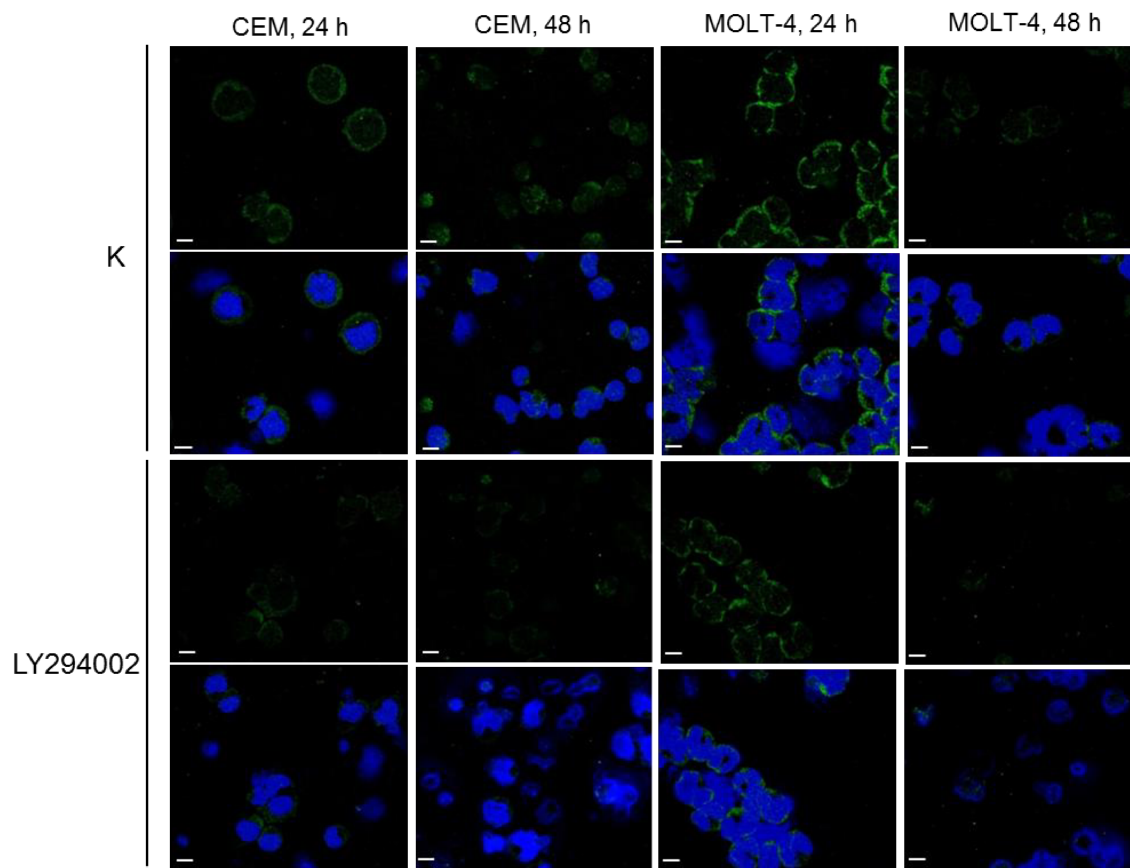


Abbildung 21: Nachweis von β -Catenin nach LY294002-Behandlung in CEM und MOLT-4.

Grün: β -Catenin, blau: DAPI. Maßstab 10 μ m

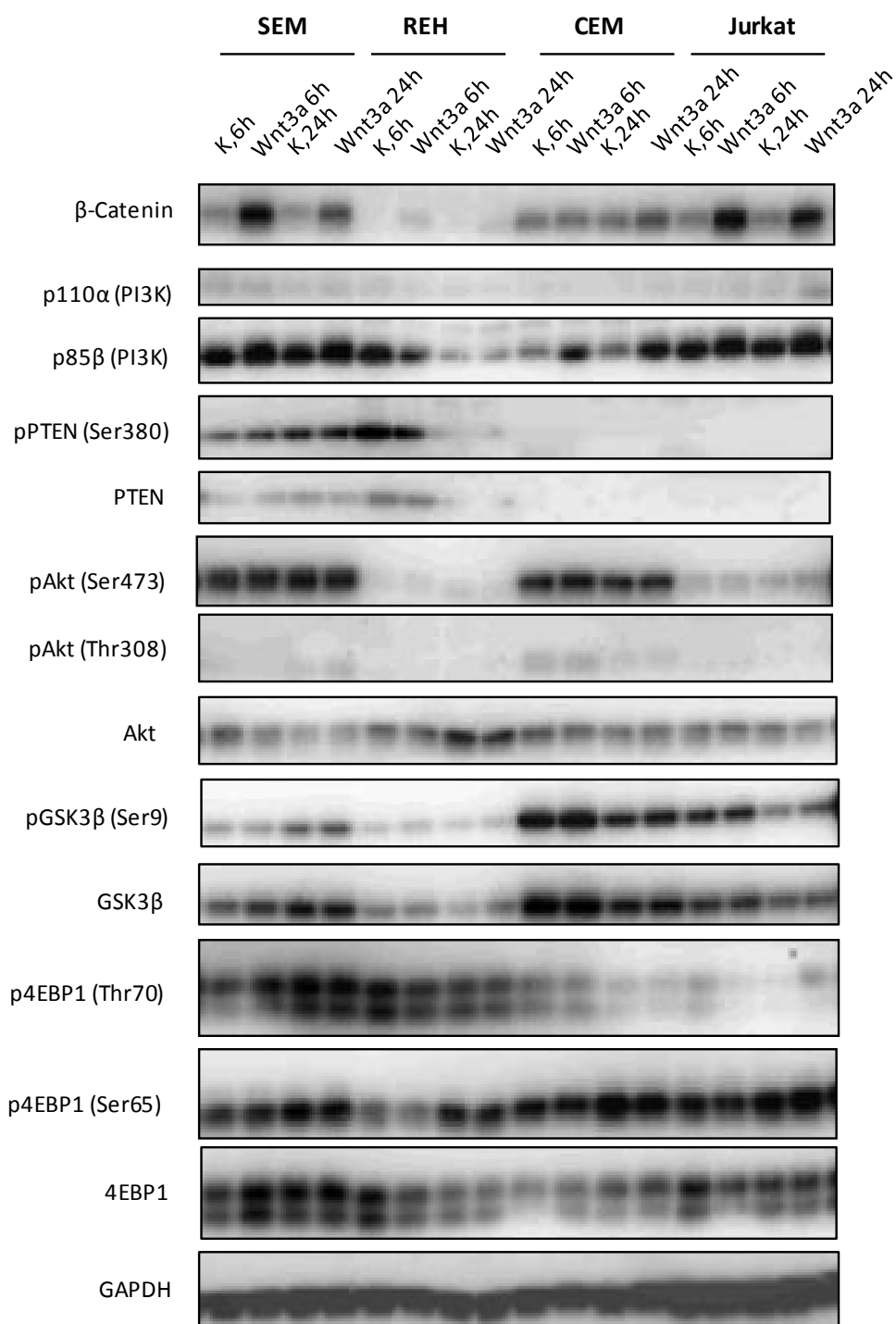


Abbildung 22: Expression von Proteinen des PI3K/Akt-Signalwegs nach Wnt3a-Stimulierung.

In den ALL-Zelllinien SEM, REH, CEM und Jurkat konnte keine Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs durch Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs nachgewiesen werden.

A	DSMZ	Hämatologisches Speziallabor UMR
	REH -X, +16, del(3)(p22), t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3), inv(12)(p13q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) - Seitenlinie mit inv(5)der(5)(p15q31), +18	-X, del(3)(p22), del(4)(q?), del(5)(q31), der(12)(p?q?), +der(16)

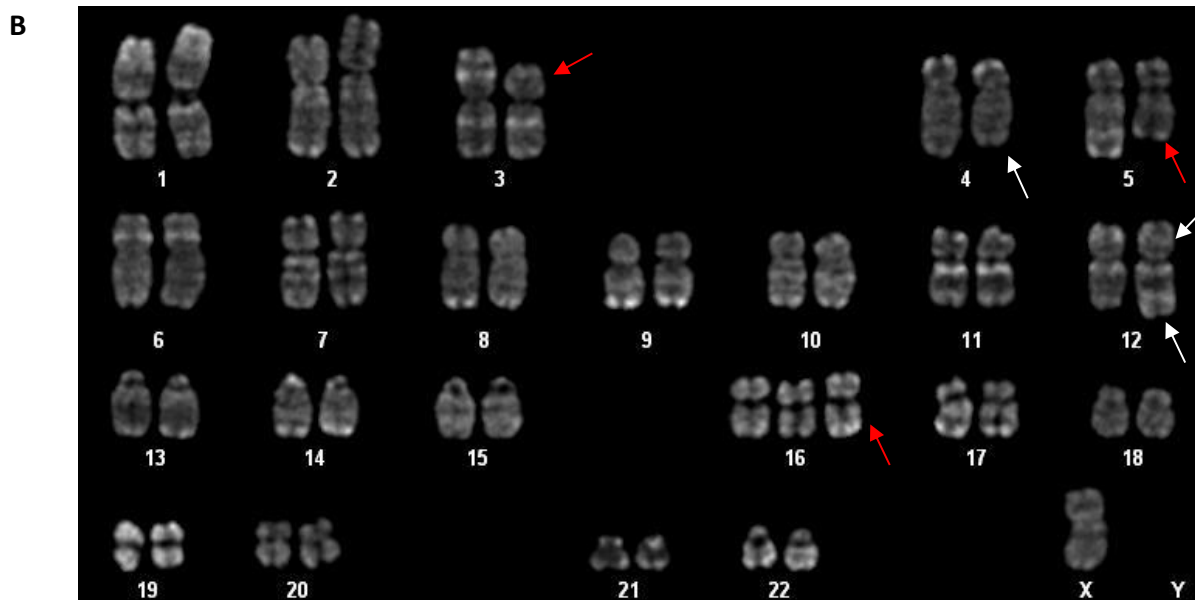


Abbildung 23: Karyogramm der ALL-Zelllinie REH.

Angegeben sind die durch die DSMZ-bereitgestellten Angaben zum Karyotypen und die durch das hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock (UMR) identifizierten dominanten zytogenetischen Aberrationen (A). Vermeintliche den Wnt/ β -Catenin-Signalweg betreffende chromosomale Veränderungen (rote Pfeile) und andere (weiße Pfeile) sind gekennzeichnet (B).

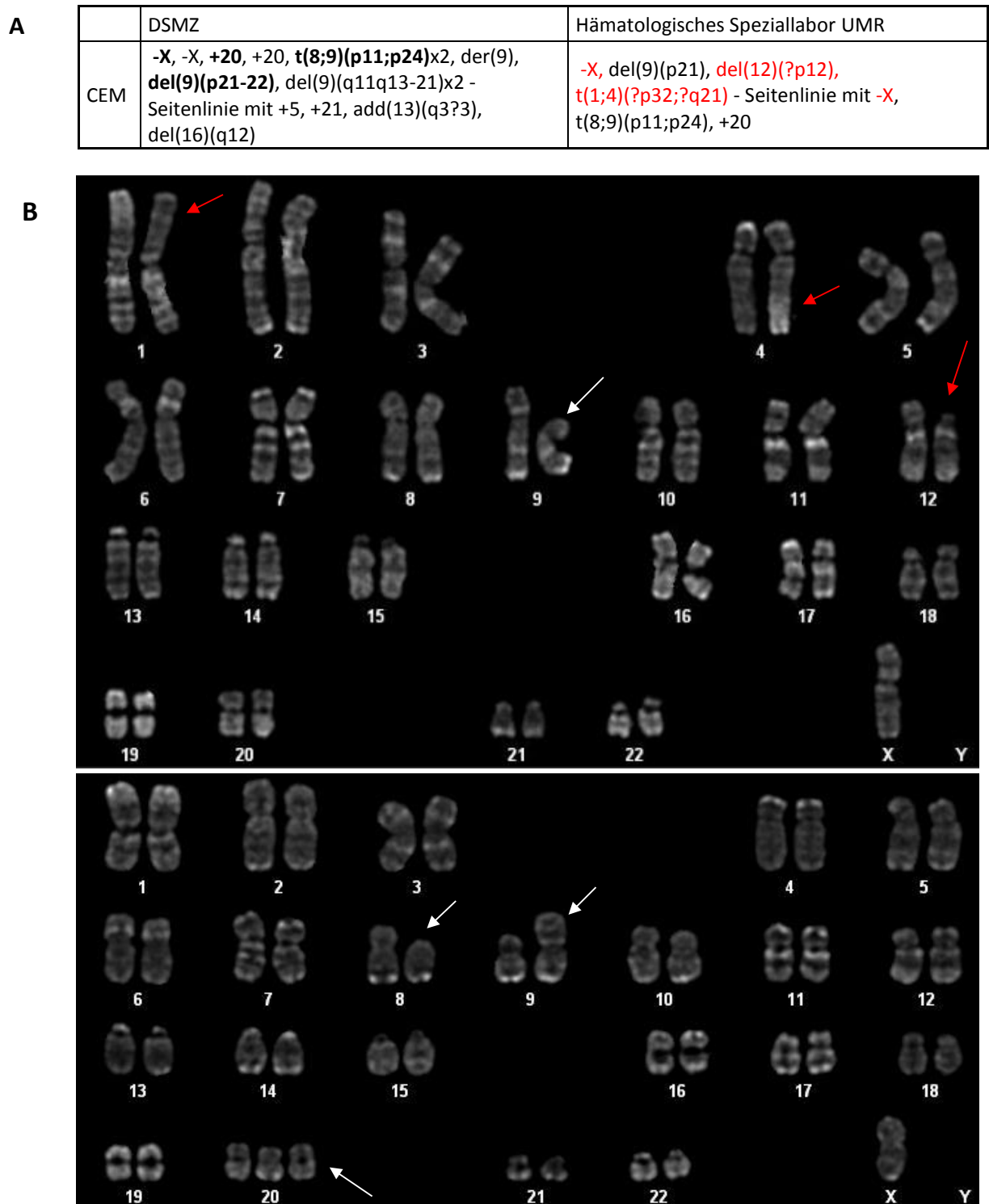


Abbildung 24: Karyogramm der ALL-Zelllinie CEM.

Angegeben sind die durch die DSMZ-bereitgestellten Angaben zum Karyotypen und die durch das hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock (UMR) identifizierten dominanten zytogenetischen Aberrationen (A). Vermeintliche den Wnt/ β -Catenin-Signalweg betreffende chromosomale Veränderungen (rote Pfeile) und andere (weiße Pfeile) sind gekennzeichnet (B).

A	DSMZ	Hämatologisches Speziallabor UMR
	RS4;11 +8, +18, t(4;11)(q21;q23) , i(7q) - Seitenlinie ohne +8/18	t(4;11)(q21;q23), i(7q) , +8

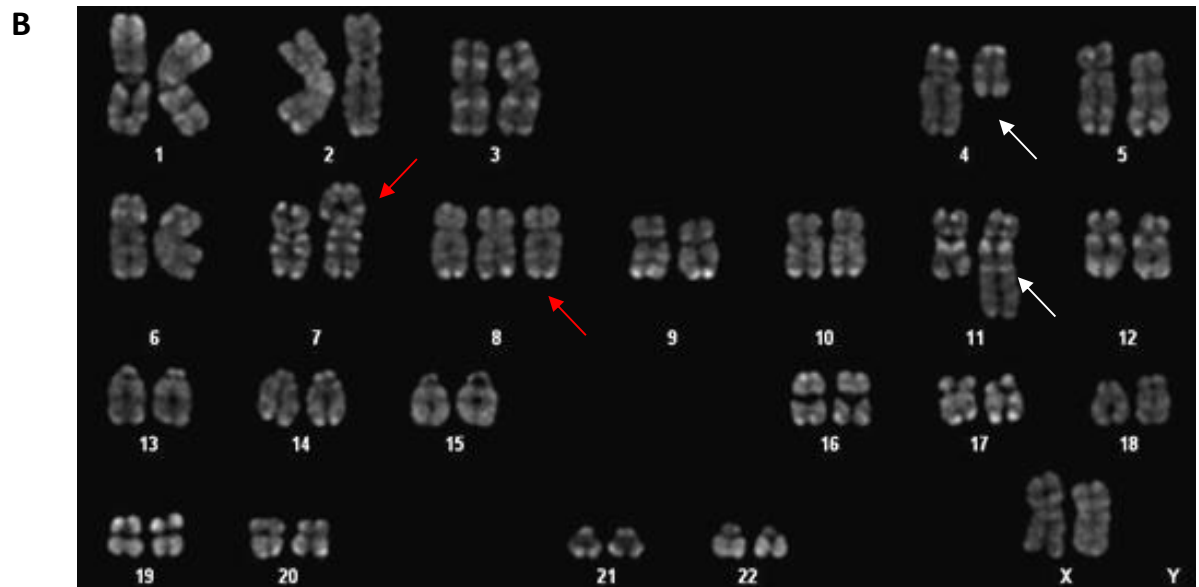


Abbildung 25: Karyogramm der ALL-Zelllinie RS4;11.

Angegeben sind die durch die DSMZ-bereitgestellten Angaben zum Karyotypen und die durch das hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock (UMR) identifizierten dominanten zytogenetischen Aberrationen (A). Vermeintliche den Wnt/ β -Catenin-Signalweg betreffende chromosomale Veränderungen (rote Pfeile) und andere (weiße Pfeile) sind gekennzeichnet (B).

A	DSMZ	Hämatologisches Speziallabor UMR
	SEM -13, t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14)	t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14), -13 - Seitenlinie mit t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14), -13, +15

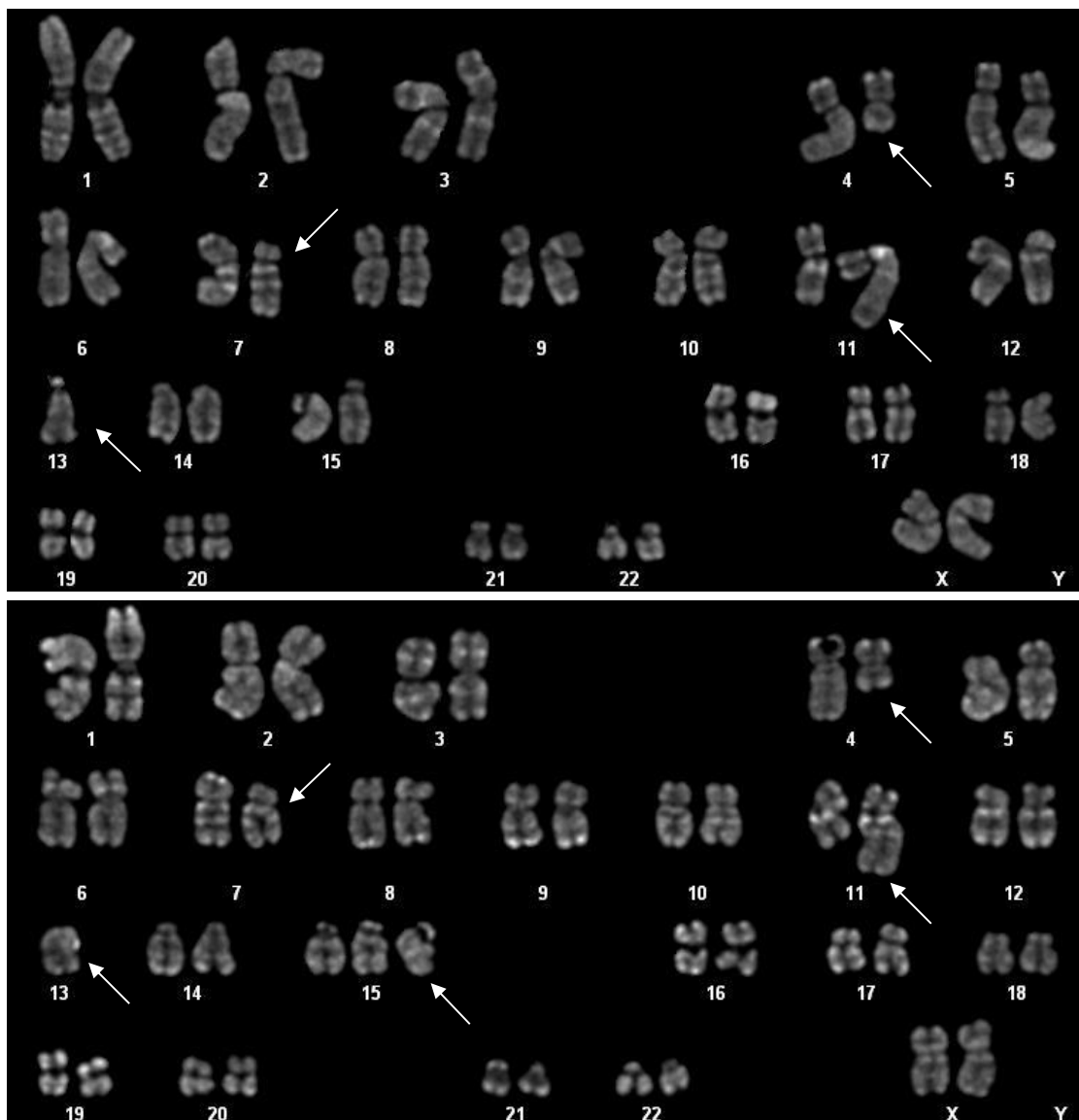
B

Abbildung 26: Karyogramm der ALL-Zelllinie SEM.

Angegeben sind die durch die DSMZ-bereitgestellten Angaben zum Karyotypen und die durch das hämatologische Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock (UMR) identifizierten dominanten zytogenetischen Aberrationen (A). Nachgewiesene chromosomale Veränderungen sind markiert (weiße Pfeile)(B).

Tabelle 22: Dominante zytogenetische Aberrationen der untersuchten ALL-Patienten.

Patient	Dominante zytogenetische Aberrationen
Pat01	inv(3)(p21;q26), der(7;8)(q10;q10),del(7)(q22), del(13)(q?14q31)
Pat02	del(11)(q23)
Pat03	+der(5)t(5;?22),-22,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)x2
Pat04	nicht bestimmt
Pat05	nicht bestimmt
Pat06	t(4;11)(q21;q23),+X,-9, +21
Pat07	del(12)(p13)
Pat08	Unauffällig
Pat09	del(11)(q23), +22
Pat10	t(9;22)(q34;q11.2), der(15), -19
Pat11	t(9;22)(q34;q11.2),+21,der(22)t(9;22)(q34;q11.2)
Pat12	t(9;22)(q34;q11.2), +22, +6, +8, +11, +14, +21
Pat13	t(9;22)(q34;q11.2), del(9)(p21)
Pat14	t(4;11)(q21;q23)
Pat15	del(6)(q21-q23), del(11)(q21-q23), +1, +19, +21, +21
Pat16	nicht bestimmt

8. WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

Name: Tina-Susann Jaswal, geb. Langhammer
Geburtsdatum: 08. September 1985
Geburtsort: Magdeburg

Hochschulstudium

Okt. 2005 - Okt. 2010 Studium der Biologie an der Universität Rostock
Okt 2009 Abschluss des Grundstudiums (Vordiplom, Note: 2,3)
Okt 2010 Abschluss des Hauptstudiums (Diplom, Note: 1,2)
Diplomarbeit: „Die Rolle von ETS-Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung des Mehlkäfers *Tribolium castaneum*“

Promotion

Apr. 2011 - „Untersuchungen zur Bedeutung und Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in akuten lymphatischen Leukämien“
Betreuer: Prof. Dr. med. Christian Junghanß,
Zentrum für Innere Medizin – Klinik III
Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
an der Universität Rostock

Förderung Stipendiatin im Rahmen der Landesgraduiertenförderung
des Landes Mecklenburg-Vorpommern
von April 2011 – Oktober 2013

Studiums begleitende und berufliche Tätigkeit

Mrz. 2008 - Dez. 2008 Studentische Hilfskraft in der Abteilung für Tiergenetik der
Universität Rostock
Feb. 2010 - Jun. 2010 Studentische Hilfskraft in der Agrobiotechnologie der Universität
Rostock
Okt. 2012 - Mrz. 2013 Unterstützende Lehrtätigkeit im Rahmen des Zytogenetik-
Praktikums der Med. Biotechnologen, Universitätsmedizin Rostock
Feb. 2013 - Sept. 2013 Studentische Hilfskraft in der Centogene AG, Rostock
seit Okt. 2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Centogene AG, Rostock

Publikationsverzeichnis**Artikel**

Kretzschmar C, Roolf C, **Langhammer TS**, Sekora A, Pews-Davtyan A, Beller M, Frech MJ, Eisenlöffel C, Rolfs A, Junghanss C. *The novel arylindolylmaleimide PDA-66 displays pronounced antiproliferative effects in acute lymphoblastic leukemia cells*. BMC Cancer. 2014 Feb 6;14:71. doi: 10.1186/1471-2407-14-71

Posterpräsentationen / Abstracts

Langhammer TS, Roolf C, Krohn S, Kretzschmar K, Huebner R, Rolfs A, Freund M, Junghanss C. *PI3K/Akt Signaling Interacts With Wnt/beta-Catenin Signaling But Does Not Induce An Accumulation of beta-Catenin In The Nucleus Of Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines*. BLOOD Volume: 122, Issue: 21, Meeting Abstract: 4886, Published: NOV 15 2013

Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen

Feb. 24 – 27, 2013

ACUTE LEUKEMIAS XIV, München

9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Junghanß für die Bereitstellung des interessanten Themas, für den regelmäßigen Austausch und die hilfreichen Anregungen sowie für die stets freundlichen und unterstützenden Begegnungen.

Ebenso danke ich Frau Dr. Catrin Roolf für die Betreuung, den regen Austausch und der kontinuierlichen Erreichbarkeit. Wann immer ich Fragen hatte oder beim „Endspurt“ Unterstützung z.B. beim Korrekturlesen benötigte, warst du zur Stelle – Danke dafür. Ich danke auch Herrn Dr. Hugo Murua Escobar für seine Hilfestellungen und Angebote des Korrekturlesens.

Der gesamten Arbeitsgruppe „AG Leukämie“ möchte ich sehr herzlich für das positive Arbeitsklima und den starken Zusammenhalt danken. Es hat immer großen Spaß gemacht mit euch zusammen zu arbeiten, Catrin, Sandra, Anett, Gudrun. Gleiches gilt für meine ehemaligen Doktoranden-Mitstreiterinnen Jule und Christin. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Saskia Krohn für die Einführung in die Zytogenetik sowie für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Karyotypisierung bedanken.

Herrn Dr. Rayk Hübner möchte ich ausdrücklich für die freundliche Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt dem Verein „Wellcome“ und der Ehrenamtlerin Franziska Weigt, die es mir ermöglicht haben den Spagat zwischen Kind und Doktorarbeit ein wenig sorgloser zu meistern.

Abschließend möchte ich mich bei meiner ganzen Familie und meinen Freunden bedanken, die immer für mich da sind und eine wichtige Konstante in meinem Leben sind.